



Einfluss von Wirtsfaktoren auf die Nipahvirus-Infektion humaner und porciner Bronchial-Epithelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lucie Sauerhering

aus Eisenach

Marburg an der Lahn

2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2009 bis April 2014 im Institut für Virologie, Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg, unter der Leitung von Prof. Dr. Andrea Maisner durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer: 1180)
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Andrea Maisner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

PD Dr. Susanne Önel

Tag der mündlichen Prüfung:

für meine Schwester

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I-IV</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>V-VI</i>
<i>Summary</i>	<i>VII-VIII</i>
I Einleitung.....	1
I.1 Das Nipahvirus (NiV).....	1
I.1.1 Epidemiologie.....	1
I.1.2 Klinisches Bild einer NiV-Infektion im Schwein und im Menschen	4
I.1.3 Taxonomie.....	6
I.1.4 Virusaufbau	7
I.1.4.1 Die Nukleokapsidproteine N, P, und L	8
I.1.4.2 Die hülassoziierten Proteine M, G und F.....	9
I.1.5 Genomaufbau.....	12
I.1.6 Replikationszyklus	13
I.2. Bronchiale Epithelzellen.....	15
I.2.1. Aufbau und Funktion von Epithelzellen	15
I.2.2 Die Lunge als wichtiger Abwehrpunkt gegen Pathogene	16
I.2.3 Vorteile bei der Verwendung von primären Epithelzellen gegenüber permanenten Zelllinien	18
I.3 Bedeutung der Wirtsproteasen Cathepsin B und Cathepsin L.....	19
I.3.1 Funktion, Biosynthese und Bedeutung	19
I.3.2 Bedeutung von Cathepsin B und L für die virale Infektion	20
I.4 Die Nipahvirus-Rezeptoren Ephrin B2 und Ephrin B3	21
I.4.1 Aufbau der Eph-Rezeptoren und der Ephrin-Liganden	23
I.4.2 Die physiologische Funktion von Ephrinen.....	24
I.5 Fragestellung	25
II Ergebnisse.....	27
II.1 Etablierung von primären Bronchial-Epithelzellen als Modellsystem	27
II.1.1 Nachweis von Epithelzell-spezifischen Markerproteinen mittels Immunfluoreszenz-Analysen.....	27
II.1.2 Effekt von TNF α auf die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 und das <i>tight junction</i> -Protein Occludin.....	30
II.2 Infektion von primären porcinen und humanen Bronchial-Epithelzellen	32
II.2.1 Infektion von subkonfluenten und polarisierten Epithelzellkulturen	32
II.2.2 Eintritt und Freisetzung von NiV aus polarisierten Bronchial-Epithelzellen.....	35
II.3 Die Rolle von Cathepsin L und B in der NiV-F-Aktivierung in Bronchial-Epithelzellen	38
II.3.1 Cathepsinaktivität in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen	38
II.3.2 Einfluss von Cathepsin-Inhibitoren auf die F-Spaltung.....	39
II.4 Expression von Wirtszellrezeptoren (Ephrine) in porcinen und humanen Bronchial-Epithelzellen.....	42
II.4.1 Nachweis der Rezeptorexpression durch RT-PCR und qPCR	43
II.4.2 Funktioneller Rezeptornachweis durch „ Overlay-Fusionsassay"	47

II.5 Einfluss der zusätzlichen Expression von humanen Ephrin-Rezeptoren auf die G- und F-vermittelte Fusionsaktivität und die NiV-Infektion in PBEPc.....	49
II.5.1 Überexpression von humanem Ephrin B2 in porcinen Bronchial-Epithelzellen.....	49
II.5.1.1 Transfektion von humanem Ephrin B2 in PBEPc.....	50
II.5.1.2 Einfluss von überexprimiertem, humanem Ephrin B2 auf die Zell-Zell-Fusion	52
II.5.2 Auswirkungen der Ephrin B2-Überexpression auf die NiV-Infektion	55
II.6 Unterschiede in der Ephrin-Expression bei verschiedenen Individuen.....	58
II.6.1 Vergleich der Rezeptorexpression in verschiedenen humanen Spendern.....	58
II. 6.2 Einfluss geringer Ephrin-Mengen auf die Infizierbarkeit von humanen Zellen	60
III Diskussion	63
III.1 Verwendung von primären Zellen als Modellsystem zur Untersuchung einer NiV-Infektion von bronchialen Epithelzellen	63
III.2 Humane Bronchial-Epithelzellen sind effizienter mit NiV infizierbar als porcine Epithelzellen.....	64
III.3 Ubiquitäre Wirtsfaktoren sind nötig für den breiten Speziestropismus von NiV	67
III.4 Cathepsine sind wichtige Wirtszellfaktoren für NiV und andere pathogene Viren ..	68
III.5 Cathepsin B ist die Aktivierungsprotease für NiV-F im Respirationstrakt vom Schwein und Mensch.....	69
III.6 Die Virusrezeptormenge auf bronchialen Epithelzellen von Mensch und Schwein unterscheiden sich	70
III.7 Auswirkungen von überexprimierten humanen Ephrin B2 auf die Fusion in PBEPc	72
III.8 Hochregulation des Rezeptors Ephrin B2 durch die NiV-Infektion	74
III.9 Variabilität der Ephrin B2-Expression in primären Bronchial-Epithelzellen vom Menschen	75
IV. Material.....	78
IV.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	78
IV.2 Antikörper	80
IV.2.1 Primärantikörper.....	80
IV.2.2 Sekundärantikörper	80
IV.3 Enzyme	80
IV.4 Inhibitoren.....	81
IV.5 Kits.....	81
IV.6 Medien	81
IV.6.1 Wachstumsmedium für eukaryotische Zellen.....	82
IV.6.2 Wachstumsmedien für prokaryotische Zellen	82
IV.7 Plasmide	82
IV.8 Puffer.....	83
IV.9 Oligonukleotide	84
IV.10 Transfektionsreagenzien	85
IV.11 Zellen.....	85
IV.11.1 Eukaryotische Zellen	85

IV.11.2 Prokaryotische Zellen	85
IV.12 Viren	85
V. Methoden	86
V.1 Molekularbiologische Methoden	86
V.1.1 Hitzeschocktransformation	86
V.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	87
V.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	87
V.1.4 RNA Isolierung	88
V.1.5 RT-PCR	88
V.1.6 cDNA-Synthese	90
V.1.7 Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qPCR)	91
V.1.8 Auswertung der qPCR	92
V.1.9 Stimulation der Zellen mit TNF α	93
V.2 Zellbiologische Methoden	93
V.2.1 Zellkultur permanenter Zelllinien	93
V.2.2 Zellzahlbestimmung	94
V.2.3 Isolierung von <i>porcine bronchial epithelial cells</i> (PBEpC) nach Bals et al., 2004	94
V.2.4 Auftauen von primären Zellen	96
V.2.5 Passagieren von primären Zellen	97
V.2.6 Transfektion von primären Zellen mit FuGENE-HD	98
V.2.7 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren	98
V.2.8 „Doppeltransfektion“ von primären Zellen	99
V.2.9 Fusionsassay	99
V.2.10 Modifizierter Fusionsassay („Overlay-Assay“) zum Nachweis der Rezeptor-Expression auf der Oberfläche von primären Zellen	100
V.2.11 Kultivierung von primären Zellen auf Filtermembranen	101
V.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden	102
V.3.1 Proteinbestimmung	102
V.3.2 Cathepsin-Aktivitätsassay	102
V.3.4 Immunpräzipitation	103
V.3.5 SDS-PAGE	104
V.3.6 Proteintransfer auf Nitrozellulose (Elektroblotting)	105
V.3.7. Westernblot mit fluoreszierenden Zweitantikörpern (LiCor-System)	106
V.3.8 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	106
V.3.9 Nachweis von NiV-Proteinen in der Immunfluoreszenz	107
V.4 Virologische Methoden	108
V.4.1 Virusanzucht	108
V.4.2 Titerbestimmung einer Virussuspension	109
V.4.3 Infektion von subkonfluenten primären Zellen	109
V.4.4 Infektion von polarisiert gewachsenen Epithelzellen auf <i>Transwell</i> -Filtern	110
V.4.5 Infektion der Zellen für die RNA-Isolation	110
VI Literaturverzeichnis	112
A1 Anhang	124
A 1.1 RT-PCR mit Ephrin B2 und Ephrin B3 spezifischen Primern (HTEpC und PTEpC)	124
A.1.2 Ephrin B2-mRNA-Level in HTEpC	124
A.1.3 Infektion von HTEpC	125

A.1.4 Ephrin B2-mRNA in alveolären Zellen	125
<i>A.2 Publikationsliste</i>	<i>126</i>
<i>A.3 Lebenslauf</i>	<i>128</i>
<i>A.4 Danksagung</i>	<i>131</i>
<i>A.5 Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>132</i>
<i>A.6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	<i>134</i>
<i>A.7 Erklärung</i>	<i>137</i>

Zusammenfassung

Das hochpathogene BSL-4 klassifizierte Nipahvirus (NiV) kann viele unterschiedliche Säugerspezies infizieren, darunter auch Schweine und Menschen. In Schweinen kommt es nach der NiV-Infektion zur Ausbildung einer akuten, respiratorischen Erkrankung und das Virus kann über Aerosole übertragen werden. Beim Menschen kommt es nur selten zu respiratorischen Symptomen und nur zu einer geringen Virusausscheidung. Das klinische Merkmal einer NiV-Infektion im Menschen ist vornehmlich eine schwere, fiebrige Enzephalitis mit hohen Mortalitätsraten. Da die NiV-Isolate aus Schweinen und Menschen in ihrer Sequenz identisch sind, kann das unterschiedliche Krankheitsbild nicht auf eine Adaptation der Viren beim Übergang vom Schwein auf den Menschen zurückgeführt werden, sondern eher auf spezies-spezifische Faktoren. Um den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus des unterschiedlichen Krankheitsverlaufs näher aufzuklären, wurden in dieser Promotionsarbeit vergleichenden Untersuchungen zur NiV-Vermehrung und -Ausbreitung in den primären Zielzellen einer NiV-Infektion, das heißt in respiratorischen Epithelzellen von Schweinen und Menschen, durchgeführt. Während für die Studien im humanen Atemwegsepithel kommerziell erhältliche primäre humane Bronchial-Epithelzellen (HBEpC) verwendet werden konnten, mussten porcine Bronchial-Epithelzellen aus Schweinelungen (PBEpC) selbst isoliert werden. Nach einer umfangreichen Charakterisierung der Zellen wurden vergleichende Infektionsstudien durchgeführt, die eindeutig zeigten, dass es hier spezies-spezifische Unterschiede gibt. Dabei waren humane Bronchial-Epithelzellen eindeutig besser und schneller infizierbar als porcine.

Um den Eintritt und die Vermehrung der Viren in respiratorischen Epithelzellen näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Wirtsfaktoren analysiert, welche für eine effiziente NiV-Vermehrung und -Ausbreitung notwendig sind. Zunächst wurde untersucht, ob es spezies-spezifische Unterschiede in der proteolytischen Aktivierung des Fusionsproteins gibt, da dies eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Virus-Zell-Fusion, beim Viruseintritt und für eine schnelle Ausbreitung der Infektion mittels Zell-Zell-Fusion darstellt. Die Aktivierung des Fusionsproteins erfolgt im Endosom einer infizierten Zelle durch die Wirtsproteasen Cathepsin L und/oder Cathepsin B. Deren Aktivität und damit die Spaltung des Fusionsproteins kann sich in verschiedenen Zellen deutlich unterscheiden. Die hier durchgeführten Aktivitäts- und Inhibitorstudien ergaben in dieser Hinsicht allerdings keinen

Unterschied. Sowohl in porcinen als auch in humanen Bronchial-Epithelzellen sorgte Cathepsin B für eine sehr effiziente Aktivierung des NiV-Fusionsproteins.

Weitere wichtige Wirtsfaktoren, die für die spezies-spezifischen Unterschiede in der Virusvermehrung verantwortlich sein könnten, sind die NiV-Rezeptoren Ephrin B2 und Ephrin B3. Unterschiede in den Rezeptormengen könnten den Eintritt der Viren und/oder die Virusausbreitung über Zell-Zell-Fusion, d.h. über Synzytienbildung, beeinflussen. Untersuchungen zur Ephrin-Expression mittels quantitativer PCR zeigten, dass die humanen Bronchial-Epithelzellen, im Unterschied zu PBEPc, mehr Ephrin B2- und Ephrin B3-mRNA besaßen. Wurde humanes Ephrin B2 in PBEPc überexprimiert, so resultierte dies in einer verstärkten Synzytienbildung und einer erhöhten NiV Freisetzung. Dies lässt darauf schließen, dass die im Vergleich zu HBEPc geringere NiV-Vermehrung in porcinen Bronchial-Epithelzellen eine Folge der geringeren Rezeptorexpression in diesen Zellen ist.

Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, wie variabel die Ephrin B2-Expression in unterschiedlichen humanen Spendern ist. Dabei zeigte sich interessanterweise, dass diese sehr stark variiert und dass HBEPc, welche geringe Ephrin B2-Level aufwiesen, auch viel schlechter mit NiV infizierbar waren. Das bestätigt, dass die Ephrin B2-Level maßgeblich für die Effizienz einer NiV-Infektion im Bronchialepithel verantwortlich sind und lässt vermuten, dass individuelle Unterschiede in der Rezeptormenge das Krankheitsbild einer NiV-Infektion mitbestimmen können.

Summary

Nipah virus (NiV) is a biosafety level 4 (BSL-4) classified paramyxovirus that is highly pathogenic for different mammalian species, including pigs and humans. Pigs develop a prominent bronchial infection with harsh cough and efficiently transmit the virus via airway secretions. In humans, respiratory symptoms are infrequently observed and, in agreement with this, virus transmission is rare. The predominant clinical sign in humans is a severe encephalitis with high mortality rates. Since there is a 100 % amino acid identity between pig and human NiV isolates, the differences in the clinical pictures cannot be due to an adaptation of the virus, but is rather due to host-specific factors. Aim of my thesis was to determine the molecular basis of the differences in porcine and human NiV infections. For this purpose, virus replication and spread was analysed in respiratory epithelial cells of pigs and humans. For the studies in human airway epithelia, commercially available human bronchial epithelial cells (HBEpC) could be used. Primary bronchial epithelial cells (PBEpC) had to be freshly isolated from pig lungs. After intensive cell characterisations, infection studies in PBEpC and HBEpC clearly revealed host-specific differences. Compared to porcine cells, infection of human bronchial epithelial cells was much more efficient.

To characterise entry and replication of NiV in respiratory epithelial cells in more detail, different host factors which are important for a productive replication of NiV were analysed. First, it was determined if there are species-specific differences in the proteolytic activation of the NiV fusion protein, an important prerequisite for functional virus entry and for spread of infection via cell-to-cell fusion. Activation of the fusion protein occurs in the endosome of infected cells and is mediated by cathepsin L and/or cathepsin B. The activity of these proteases, and consequently cleavage of the fusion protein, could be different in HBEpC and PBEpC. However, protease activity and inhibitor studies did not reveal any difference. In both, porcine and human bronchial epithelial cells, cathepsin B is the predominant host cell protease which efficiently activates the NiV fusion protein.

Further important host factors that could be responsible for the species-specific differences in infection are the NiV receptors ephrin B2 and ephrin B3. Differences in receptor levels can influence the viral entry and/or the spread of infection by cell-to-cell fusion (syncytia formation). Receptor expression studies using quantitative PCR showed that HBEpC express higher ephrin B2 and ephrin B3 mRNA levels compared to PBEpC. Additional expression of human ephrin B2 in PBEpC resulted in a more efficient cell-to-cell fusion and an increased

virus release. These results suggest that the reduced receptor expression in porcine epithelial cells is the reason for the inefficient NiV replication in PBEpC.

In the last part of this thesis, ephrin B2 expression in epithelial cells of different human donors was determined. Interestingly, we found a great variability in the ephrin B2-levels of different individuals. The finding that infection of HBEpC with low ephrin B2-levels was clearly decreased then confirmed that high ephrin B2-levels are needed for an efficient NiV infection of respiratory epithelial cells. This further suggests that not only inter-species but also individual variations in NiV receptor levels contribute to the different clinical outcomes of a NiV infection.

I Einleitung

I.1 Das Nipahvirus (NiV)

I.1.1 Epidemiologie

Im Zeitraum zwischen 1998 und 1999 kam es in Malaysia und Singapur zum gehäuftem Auftreten von schweren, fiebrigen Enzephalitiden. Während dieses Ausbruchs wurden 283 erkrankte Menschen gemeldet, von denen insgesamt 109 verstarben (Mortalitätsrate von 39 %: Chua et al. 2000; *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC), 1999). Erste Vermutungen deuteten auf das Virus der Japanischen Enzephalitis (JEV) als Ursache für die Erkrankung hin. Auffällig war allerdings, dass es sich bei den Betroffenen meist um Schweinezüchter und Mitarbeiter von Schlachtbetrieben handelte (Chua et al., 1999). Man konnte sogar eine direkte Beziehung zwischen dem Auftritt der Krankheit und dem Transport von Schweinen erkennen (Aziz et al., 1999; Wong et al., 2002). Schließlich konnte im Frühjahr 1999 aus dem Liquor eines Patienten aus *Kampung Sungai Nipah* der Erreger isoliert werden. Das bis dato unbekannte Virus wurde nach dem Wohnort des Patienten Nipahvirus (NiV) genannt. Bei NiV handelte es sich um ein zoonotisches Paramyxovirus, welches molekulare und antigenische Ähnlichkeiten mit dem Hendravirus (HeV) aufwies (Chua et al., 2000; Wang et al., 2000). Das HeV trat erstmals in Australien 1994 in Pferden und Menschen auf (Murray et al., 1995). Seit 2012 ist ein weiterer Vertreter, das Cedarvirus (CedV), beschrieben, welches in Australien aus Flughunden isoliert wurde (Marsh et al., 2012).

Fruchtfressende Flughunde der Gattung *Pteropus*, die im südostasiatischen Raum weit verbreitet ist, konnten als natürlicher Wirt des NiV identifiziert werden. Aber auch in Flughunde der Gattung *Eidolon*, deren Verbreitungsgebiet Subsahara-Afrika ist, konnten in weiteren Untersuchungen Antikörper gegen NiV gefunden werden (Hayman et al., 2008). Flughunde beider Gattungen zeigen nach Infektion mit NiV keine Krankheitssymptome, können das Virus aber über Urin und Speichel ausscheiden (Yob et al., 2001; Halpin et al., 2007). Hierin bleibt das Virus mehrere Tage infektiös (Fogarty et al. 2008). Schweine können sich über Kontakt mit Ausscheidungen der Flughunde oder angefressenen Früchten infizieren und übertragen das Virus dann über Aerosole oder über direkten Kontakt auf

andere Schweine oder Menschen (Anonymous, 1999; Chua et al., 2000). Die Übertragung von NiV auf das Schwein ist vermutlich die Folge von menschlichen Eingriffen in die ökologische Nische der Flughunde. Innerhalb der Schweinepopulation bot die Masthaltung auf engem Raum dann optimale Bedingungen für die weitere Virusausbreitung, welche durch Viehtransporte verstärkt wurde (Field et al., 2001; Eaton et al., 2005).

Retrospektive Untersuchungen lassen vermuten, dass es bereits schon 1996 in Malaysia zu Infektionen von Schweinen mit NiV kam und dass das Virus über Transport der infizierten Tiere bis nach Singapur gelangte (Aziz et al., 1999; Wong et al., 2000).

Nach den initialen Ausbrüchen 1998/99 kam es 2002 in Nordindien und seit 2001 gehäuft in Bangladesch zu erneuten NiV-Ausbrüchen (Enserink, 2004; Butler, 2004). Hier geht man von einer direkten Übertragung des Virus von Flughunden auf den Menschen aus. In vielen Fällen wird eine Mensch-zu-Mensch Übertragung vermutet. Die Mortalitätsrate in diesen jüngeren Ausbrüchen war mit über 60 % deutlich höher als bei dem ersten Ausbruch in Malaysia (Choi et al., 2004; Anonymous, 2004). Nahezu jedes Jahr wird von neuen Ausbrüchen in Bangladesch berichtet. Zu Beginn des Jahres 2013 kam es zu 24 Fällen einer NiV-Infektion in Bangladesch. 21 Personen verstarben aufgrund der Infektion (Institute of Epidemiology, Disease Control and Research, Bangladesch). In der Tabelle I.1 sind alle Patienten mit Geschlecht, Alter und Krankheitsverlauf zusammen gefasst. Dabei lässt sich kein Zusammenhang zwischen Alter und Ausgang der Infektion erkennen. Allerdings ist zu erwähnen, dass z.B. in Manikganj gehäufte Infektionen aufgetreten sind. Wahrscheinlich ist dies auf eine Mensch-zu-Mensch Übertragung zurück zu führen.

Tab. I.1: Zusammenfassung des größten NiV-Ausbruchs 2013 in Bangladesch (Quelle: http://www.iedcr.org/index.php?option=com_content&view=article&id=106).

Alter (Jahre)	Geschlecht	Ort	Folge	Alter (Jahre)	Geschlecht	Ort	Folge
24	m	Rajbari	verstorben	7	m	Kurigram	verstorben
11	m	Jhenaidah	verstorben	55	m	Nilphamari	verstorben
8	m	Naogaon	verstorben	45	w	Nilphamari	verstorben
35	w	Nator	verstorben	5	w	Kushtia	verstorben
0,7	m	Natore	überlebt	32	m	Naogaon	verstorben
9	m	Gaibandha	verstorben	40	m	Naogaon	verstorben
8	m	Mymensingh	verstorben	1,8	m	Magura	verstorben
41	m	Mymensingh	verstorben	53	m	Manikganj	verstorben
3	w	Pabna	überlebt	39	w	Manikganj	verstorben
43	m	Pabna	verstorben	7	w	Manikganj	überlebt
30	w	Rajshahi	verstorben	60	w	Manikganj	verstorben
48	m	Nilphamari	verstorben	30	m	Manikganj	verstorben

Der westliche Teil von Bangladesch wird als sogenannter „*Nipah-belt*“ angesehen. Dazu gehören die Distrikte Meherpur, Noagoan, Rajbari, Faridpur, Tangail, Thakurgaon, Kushtia, Manikgonj, Rajshahi, und Lalmonirhat. Hier kam es zu vermehrten Auftreten von NiV-Ausbrüchen seit 2001, vermutlich aufgrund der Verbreitung der Flughunde. Auch die jüngsten Ausbrüche von 2013 fanden innerhalb des „*Nipah-belt*“ statt (Abb.I.1).

Nipah-Ausbruch in Bangladesch 2013



Abb. I.1: Geografische Verteilung des NiV-Ausbruchs in Bangladesch 2013 (Quelle: http://www.iedcr.org/index.php?option=com_content&view=article&id=106).

NiV-Infektionen im Menschen traten saisonal auf, meist während des Winters (Mitte Dezember bis Mitte Februar). Luby und Kollegen konnten einen Zusammenhang zwischen dem Konsumieren von rohem Dattelpalmensaft und dem Auftreten von Infektionen

nachweisen (Khan et al., 2012). In Bangladesch trinkt man während des Winters süßen Palmensaft. Die Gewinnung erfolgt durch Anritzen der Rinde der Silber-Dattelpalme (*Phoenix sylvestris*). Der Saft kann dann aus dem Stamm in ein angebrachtes Gefäß laufen und gesammelt werden (Luby 2013; Nahar et al., 2010). Über Ausscheidungen von NiV-infizierten Flughunden, welche nachts aus den mit Palmensaft gefüllten Gefäßen trinken, gelangt das Virus dann in den Palmensaft. Wird der Palmensaft roh getrunken, dann gelangt das Virus in den Menschen. Das NiV ist sehr robust und kann bis zu 7 Tagen im Palmensaft infektiös bleiben (de Wit et al., 2014).

I.1.2 Klinisches Bild einer NiV-Infektion im Schwein und im Menschen

Beim Menschen kommt es nach weniger als zwei Wochen Inkubationszeit zum Ausbruch der Erkrankung. Dabei sind die ersten Symptome eher grippeähnlich mit Kopfschmerzen, hohem Fieber, Schwindel und Myalgien bevor es zum Auftreten einer schweren, fiebrigen Enzephalitis kommt. Diese lässt sich bei ca. 75 % der Patienten bereits in frühen Stadien anhand pathologischer Liquorbefunden nachweisen (Chua et al., 1999; Goh et al., 2000). Die Enzephalitis führt zu Benommenheit, Orientierungslosigkeit, Krämpfen, Koma und in mindestens 40 % aller symptomatischen Fälle zum Tod (WHO, 2001). Bei Überlebenden kann es zu Spätfolgen wie Depressionen, Veränderung in der Persönlichkeit und Epilepsien kommen (Ng et al., 2004; Sejvar et al., 2007). Zudem zeigen Studien, dass es bei Überlebenden einer akuten Infektion oder bei zunächst symptomlos Infizierten zu *relapsed* oder *late-onset* Enzephalitiden kommt. Diese Daten deuten darauf hin, dass NiV im Hirngewebe persistiert (Tan et al., 2002; Wong et al., 2002).

Die Ausbreitung der Nipahviren und den Krankheitsverlauf im Menschen stellt man sich wie folgt vor (Wong et al., 2002): Nach Übertragung des Virus über Tröpfchen werden zunächst Epithelzellen des Respirationstraktes infiziert und es findet dort eine erste Replikation statt. Im Verlauf der respiratorischen Infektion überwindet das Virus die Epithelbarriere und gelangt ins Blut. Im Anschluss erfolgt eine systemische Infektion von Endothelzellen kleinerer Gefäße vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS), aber auch im Herz, der Lunge und den Nieren. Die ausgeprägte Infektion von Hirnendothelzellen verursacht eine Vaskulitis und damit die Bildung von Thromben und Nekrosen in Hirngefäßen. Dadurch kommt es in der weißen Substanz, im Kleinhirn und im Hirnstamm zur Ausbildung von lytischen Nekrosen

(Plaques). Da das Virus auch die Blut-Hirn-Schranke überwindet, kommt es neben der starken Infektion des Hirnendothels auch zur Virusinfektion von Neuronen und Gliazellen. Alles zusammen kann letztendlich das klinische Bild einer schweren multifokalen Nipahvirus-Enzephalitis hervorrufen (Chua et al., 2000). Die Diagnose „NiV-Infektion“ erfolgt aufgrund der Krankheitsgeschichte und der Symptomatik. Im Blut und Liquor lassen sich IgM- und IgG-Antikörper gegen die viralen Oberflächenproteine mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) nachweisen (Kashiwazaki et al., 2000; Chen et al., 2006). Danach dienen die Polymerase-Kettenreaktion nach Reverser Transkription (RT-PCR) und damit der Nachweis viraler RNA (Guillaume et al., 2004; Wacharapluesadee and Hemachudha, 2007) und die Virusisolation als Nachweismethoden (Chow et al., 2000; Daniels et al., 2001; Bossart et al., 2007).

Auch wenn der prinzipielle Infektionsverlauf bei Schweinen und Menschen ähnlich ist, ist die Infektion des Respirationstrakts und die entsprechende respiratorische Symptomatik beim Schwein sehr viel ausgeprägter als beim Menschen. Dies ist auch durch einige immunhistochemische Untersuchungen belegt, die zeigen, dass bei an einer NiV-Infektion verstorbenen Menschen nur gelegentlich Virus-positive Bronchialepithelzellen gefunden werden, während das respiratorische Epithel im Schwein sehr stark infiziert ist (Abb. I.2).

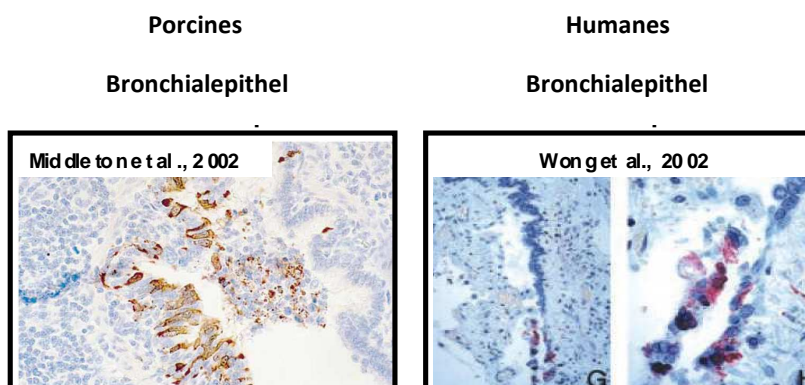


Abb. I.2.: Immunhistochemischer Nachweis der NiV-Infektion im Bronchialepithel.

Ein weiterer Unterschied ist zudem, dass infizierte Schweine das Virus, im Gegensatz zum Menschen, sehr effizient über respiratorische Sekrete übertragen. In Tierexperimenten mit

NiV-infizierten Schweinen, konnte gezeigt werden, dass bereits 2 Tage nach der Infektion, in Nasenabstrichen NiV nachweisbar ist (Weingartl et al., 2005). Die infizierten Schweine husten und niesen im weiteren Verlauf der Infektion NiV über respiratorische Sekrete aus. Aufgrund ihres Schnüffel-Verhaltens kann dann das in den Auswürfen enthaltene NiV von anderen Schweinen aufgenommen werden. In Schweinen kommt es bei der Infektion mit dem NiV zum Auftreten einer hochkontagiösen, akuten respiratorischen Erkrankung, dem „Brüllhusten“ (Chua et al., 2000; Mohd Nor et al., 2000). Die Übertragung auf den Menschen erfolgte wahrscheinlich über Aerosole oder direkten Kontakte mit Schlachtprodukten bei Arbeiten mit den Schweinen (Chua et al., 2000). Der NiV-Ausbruch in Malaysia konnte so erst durch Keulung von Millionen von Schweinen eingedämmt werden (Anonymous, 1999; Chua et al., 2000).

Aufgrund der hohen Mortalitätsrate, dem breiten Wirtsspektrum und des Fehlens eines Impfstoffes und einer antiviralen Therapie wird das NiV als Erreger der Sicherheitsstufe 4 (*biosafety level 4*, BSL4) eingestuft.

I.1.3 Taxonomie

Das NiV gehört zur Ordnung der *Mononegavirales*. Dabei handelt es sich um umhüllte Viren, welche ein einzelsträngiges, nichtsegmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung besitzen. Die *Mononegavirales* umfassen vier Familien: Filo-, Borna-, Rhabdo- und Paramyxoviren (Murphy et al., 1995). Die *Paramyxoviridae* wiederum gliedern sich in zwei Unterfamilien: die Pneumovirinae und die Paramyxovirinae. Zusammen mit dem Hendravirus (HeV) bildet das NiV innerhalb der Paramyxovirinae das Genus der Henipaviren (Wang et al., 2000). Im Jahr 2012 konnte in australischen Flughunden ein neues Virus aus Urinproben isoliert werden, das nicht human-pathogene Cedar Virus (CedV, Marsh et al., 2012). Es wies Ähnlichkeiten mit HeV und NiV in Bezug auf Genomgröße (18162 nt) und viralen Rezeptor (Ephrin B2, aber nicht Ephrin B3) auf und wird als dritter Vertreter des Genus Henipaviren angesehen.

Tab. I.2: Charakteristische Vertreter der *Paramyxoviridae*.

Unterfamilie	Genus	charakteristische Vertreter
Pneumovirinae	Pneumovirus	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus (HRSV) Bovines Respiratorisches Synzytialvirus (BRSV)
	Metapneumovirus	Humanes Metapneumovirus (HMPV)
Paramyxovirinae	Avulavirus	Newcastle Disease Virus (NDV)
	Morbillivirus	Masernvirus (MV) Hundestaupavirus (CDV) Rinderpestvirus (RPV)
	Respirovirus	Humane Parainfluenzaviren Typ 1 und 3 (HPIV) Sendai Virus (SeV)
	Rubulavirus	Mumpsvirus (MuV) Simian Virus 5 (SV5)
	Henipavirus	Nipahvirus (NiV) Hendravirus (HeV)

I.1.4 Virusaufbau

Wie alle Viren der *Mononegavirales* ist das NiV ein umhülltes Virus mit einer variablen Größe von im Durchschnitt 40 bis 1000 nm (Hyatt et al., 2001; Goldsmith et al., 2003). Die Partikel sind pleomorph und die Virionen sind sphärisch, können aber auch filamentös vorliegen (Hyatt et al., 2001; Goldsmith et al., 2003; Modrow et al., 2003). Die Virushülle leitet sich von der Wirtsmembran ab und wird im Laufe des *budding*-Prozesses, dem Abschnüren des Viruspartikels, vom Virus mitgenommen. Die beiden viralen Oberflächenglykoproteine sind dabei in die Lipidmembran integriert. Hierbei handelt es sich um das Glykoprotein (G) und das Fusionsprotein (F). Im Inneren des Partikels findet sich das einzelsträngige (*single stranded*, ss), nichtsegmentierte RNA-Genom, welches enkapsidiert wird vom Nukleoprotein (N), dem Phosphoprotein (P) und der Polymerase (L) und das helikale Nukleokapsid bildet. Die Interaktion des Nukleokapsids mit der Virushülle wird durch das Matrixprotein (M)

ermöglicht, welches die Innenseite der Lipidmembran auskleidet. In Abb. I.3 ist ein Viruspartikel schematisch dargestellt. Alle Komponenten werden in den nachfolgenden Abschnitten einzeln erklärt.

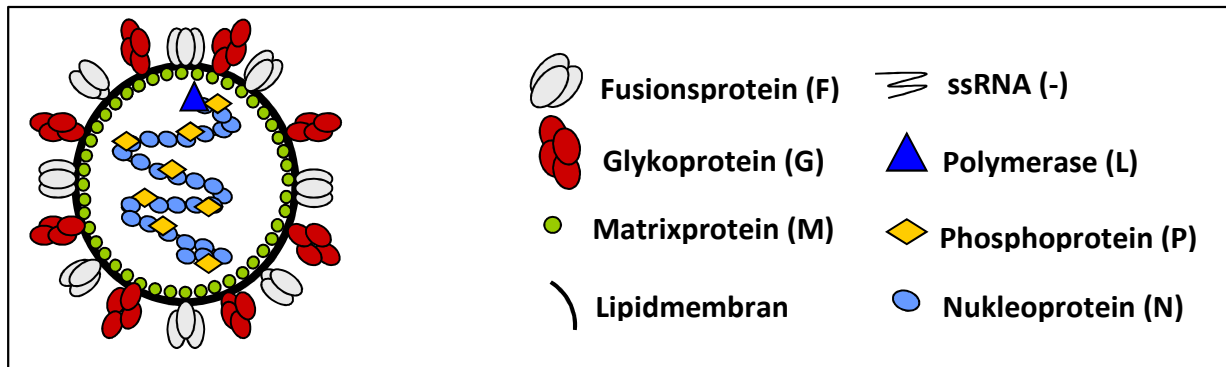


Abb. I.3: Virusaufbau des NiV: N: Nukleoprotein; P: Phosphoprotein; M: Matrixprotein; F: Fusionsprotein; G: Glykoprotein; L: Polymerase (nach Harcourt et al., 2000).

I.1.4.1 Die Nukleokapsidproteine N, P, und L

Das Nukleoprotein (N) hat eine Länge von 532 Aminosäuren (AS) und ein Molekulargewicht von 58 kD (Harcourt et al., 2000; Modrow et al., 2003). Es liegt im Viruspartikel in hoher Kopienzahl vor und umgibt das gesamte RNA-Genom. Die so erhaltene Flexibilität ist essentiell bei der engen Verpackung des Genoms im Virion und bildet gleichzeitig einen Schutz vor enzymatischem Abbau. Zudem vermittelt das N-Protein die Wechselwirkung zwischen dem RNA-Genom, den weiteren Kapsidproteinen P und L und dem Matrixprotein. Weiterhin besitzt das N-Protein eine regulatorische Funktion und ist als Teil des Polymerasekomplexes wichtig für die Umschaltung von Transkription zu Replikation.

Das Phosphoprotein (P) hat eine Länge von 709 AS und ist mit einer Größe von 98 kD im Vergleich zu P-Protein anderer Paramyxoviren sehr groß (Harcourt et al., 2000; Wang et al., 2001). Als Bestandteil des Nukleokapsidkomplexes fungiert das P-Protein als Kofaktor der Polymerase L (Harcourt et al., 2000; Wang et al., 2001; Modrow et al., 2003). Neben dem Strukturprotein P kodiert das P-Gen für weitere offene Leserahmen. Während des Transkriptionsprozesses werden m-RNAs für die Nichtstrukturproteine C, V und W in der Wirtszelle gebildet, aber nicht in die Virionen eingebaut. Dabei entstehen das V- und das W-Protein durch RNA-editing und das C-Protein durch Verwendung eines alternativen

Startkodons. Alle drei viralen Proteine sind wichtige Antagonisten der Interferon (IFN)-Antwort. Das V- und das W-Protein wirken auf die IFN–Typ I-Antwort durch Komplexbildung und Retention der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 (*signal transducers and activators of transcription*). Weiterhin kann das W-Protein im Zellkern wirken. Auch das C-Protein hat eine Interferon-antagonistische Wirkung und erhöht dadurch die Virulenz und Infektionseffizienz der Paramyxoviren (Baron and Barrett, 2000; Patterson et al., 2000; Park et al., 2003). Wie bedeutend das P-Protein für die Abwehr der wirtseigenen Immunantwort ist, konnte in neusten Studien mit dem einzigen nicht human-pathogenen Henipavirus, dem CedV, gezeigt werden. Der größte Unterschied zwischen den human-pathogenen HeV und NiV und dem nicht human-pathogenen CedV liegt im P-Gen. Hier konnte kein RNA-Editing gefunden werden (Marsh et al., 2012), wodurch es zum Fehlen des V-Proteins kommt. Dadurch kann die Immunantwort nicht blockiert werden, weshalb es auch zu einer drastischen Hochregulation der IFN β -mRNA kommt, welche bei Infektionen mit NiV und HeV nicht zu messen ist (Marsh et al., 2012).

Das L-Protein (L für *large*) ist mit 2244 AS und 258 kD das größte Protein im Viruspartikel. Hierbei handelt es sich um die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Wang et al., 2001). Zusammen mit dem P- und dem N-Protein bildet sie den Polymerasekomplex und ist dort die enzymatisch aktive Untereinheit, die für die Transkription und Replikation des viralen Genoms, aber auch für die *capping*- und Polyadenylierungsreaktionen der viralen mRNAs verantwortlich ist (Modrow et al., 2003).

I.1.4.2 Die hülassoziierten Proteine M, G und F

Das Matrixprotein (M) besteht aus 352 AS und hat eine Größe von 40 kD (Harcourt et al., 2000). Es kleidet die Innenseite der Virushüllmembran aus und liegt dabei als oligomere Schicht vor. Das M-Protein vermittelt durch Interaktion mit dem Nukleokapsid einerseits und den zytoplasmatischen Domänen der viralen Glykoproteine andererseits eine Verbindung zwischen dem Nukleokapsid und der Lipidmembran. Durch diese vielfältigen Wechselwirkungen spielt das M-Protein eine essenzielle Rolle beim viralen *assembly* und *budding* an der Wirtszellmembran (Takimoto and Portner, 2004; Patch et al., 2007; Lamb, 2008). Dabei spielt die potentielle *late domain* an Position ⁶²YMYL⁶⁵ als Transportsignal vermutlich eine entscheidene Rolle, denn Mutationen an diesem Motiv verhindern die

Freisetzung von virusähnlichen Partikeln (VLP) (Ciancanelli and Basler, 2006). Aufgrund seiner apikalen Akkumulation in späten Phasen einer Epithelzell-Infektion ist das M-Protein dafür verantwortlich, dass NiV hauptsächlich apikal freigesetzt wird (Lamp et al., 2013).

Das Glykoprotein (G) besteht aus 602 AS und hat ein Molekulargewicht von ca. 78 kD. Es ist ein Typ-II-Transmembranprotein und für die Rezeptorbindung verantwortlich. In seiner Ektodomäne besitzt es sieben potenzielle N-Glykosylierungsstellen (Harcourt et al., 2000). Wie die Rezeptor-bindenden Proteine anderer Paramyxoviren bildet das NiV-G über Disulfidbrücken Dimere. Diese Dimere können sich dann auf der Oberfläche von infizierten Zellen oder im Virion zu nicht kovalenten Tetrameren zusammenlagern (Crennell et al., 2000; Modrow et al., 2003). Anders als die Rezeptor-bindenden Proteine anderer *Paramyxoviridae* besitzt das NiV-G keine hämagglutinierende und auch keine Neuraminidase-Aktivität. Das NiV-G bindet spezifisch an die beiden zellulären Rezeptoren Ephrin B2 und Ephrin B3 und ist somit für die Adsorption des Virions an der Wirtszelle verantwortlich. Das Glykoprotein ist somit zusammen mit dem Fusionsprotein F von entscheidender Bedeutung für die Membranfusion (Bossart et al., 2002; Tamin et al., 2002; Bonaparte et al., 2005; Negrete et al., 2005 und 2006).

Das Fusionsprotein F besteht insgesamt aus 546 AS und hat eine Größe von 69 kD (Harcourt et al., 2000). Das NiV-F ist ein Typ-I-Membranprotein und es liegt in Analogie zu anderen paramyxoviralen F-Proteinen als Trimer auf der Oberfläche von infizierten Zellen bzw. in der Virushülle vor (Eaton et al., 2004). Es wird zunächst als inaktives Vorläuferprotein F_0 synthetisiert und muss dann in seine beiden Untereinheiten F_1 und F_2 gespalten werden, um biologisch aktiv zu sein. Die beiden Untereinheiten bleiben über Disulfidbrücken verbunden (Moll et al., 2004). Die Spaltung erfolgt an der basischen Aminosäure Arginin (R_{109}). Im gespaltenen NiV-F bilden 28 AS den C-terminalen, zytoplasmatischen Teil von F_1 (Harcourt et al., 2000). Hier ist neben einem Endozytosesignal, auch ein Aminosäuremotiv vorhanden, welches über einen *inside-out* Signalmechanismus auf den extrazellulären Proteinanteil wirkt und so die Fusionsaktivität beeinflusst (Aguilar et al., 2007). Das Fusionspeptid, welches aus 20 hydrophoben Aminosäuren besteht, ist am N-Terminus der Untereinheit F_1 zu finden. Dieses inseriert in die Ziellmembran und leitet den Fusionsprozess ein. Des Weiteren befinden sich in der F_1 -Untereinheit zwei und in der F_2 -Untereinheit drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen. Es werden zwei Stellen in der F_2 -Untereinheit und beide in der F_1 -

Untereinheit zur Glykosylierung genutzt. Die beiden N-Glykane in F_1 sind notwendig für die Spaltung des F-Proteins und dessen Oberflächentransport (Moll et al., 2004). Außerdem vermitteln die N-Glykane eine schützende Wirkung gegenüber neutralisierenden Antikörpern (Aguilar et al., 2006). Die proteolytische Aktivierung des NiV-F unterscheidet sich von anderen Fusionsproteinen der *Paramyxoviridae* und wird in den nachfolgenden Kapiteln näher beschrieben.

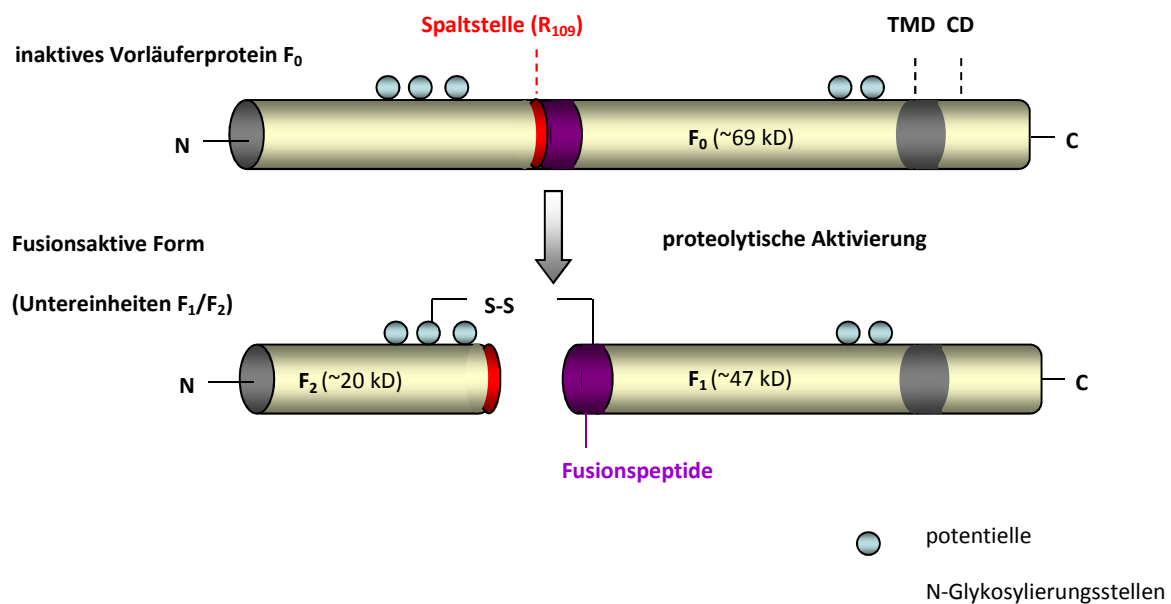


Abb. I.4: Darstellung des NiV-Fusionsproteins. Durch proteolytische Spaltung wird das Vorläuferprotein F_0 in seine beiden Untereinheiten F_1 und F_2 prozessiert. Diese bleiben über Disulfidbrücken verbunden. TMD: Transmembrandomäne; CD: zytoplasmatische Domäne.

Die Aufgabe des F-Proteins liegt in der Vermittlung der Fusion von Virushülle mit der Wirtszellmembran beim Viruseintritt (Lamb und Kolakofsky, 2001) sowie der Zell-Zell-Fusion infizierter Zellen mit Rezeptor-tragenden Nachbarzellen. Diese Zell-Zell-Fusion führt zur Entstehung mehrkerniger Riesenzellen, den Synzytien (Bossart et al., 2002; Tamin et al., 2002). Bindet das G-Protein an die Rezeptoren Ephrin B2 oder Ephrin B3, dann kommt es zunächst zu einer Konformationsänderung im NiV-G und anschließend auch im NiV-F (Lamb et al., 2006). Dadurch wird das Fusionspeptid exponiert und kann im Folgenden in die Membran der Wirtszelle inserieren. In der F_1 -Untereinheit befinden sich zwei α -helikale Domänen (*heptad repeats*, HR) durch die eine weitere Veränderung der Konformation

vermittelt wird. Die Zusammenlagerung dieser beiden HRs resultiert in der Ausbildung einer *coiled-coil* Struktur. Dieses Bündel klappt weg und führt dadurch zu einer räumlichen Annäherung von Wirtsmembran und Virushülle, so dass zunächst die beiden äußeren Lipidschichten (Hemifusion) und im Anschluss die Membranen komplett verschmelzen (Dutch et al., 2000; Xu et al., 2004; Earp et al., 2005; Lou et al., 2006).

I.1.5 Genomaufbau

NiV hat ein einzelsträngiges, nicht segmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung. Mit seinen 18.246 Basen (Chan et al., 2001) erfüllt es die *rule of six*, d.h. das Genom besteht aus einer durch sechs teilbaren Nukleotidzahl. Dies ist wichtig für eine erfolgreiche Replikation, denn das Nukleoprotein enkapsidiert genau sechs Nukleotide und die Aktivität des Promotors am 3'-Ende des Genoms ist von der relativen Lage zu den N-Monomeren abhängig (Calain and Roux, 1993; Vuilliamoz and Roux, 2001; Halpin et al., 2004). Das Genom weist die gleiche Organisation wie die Genome anderer *Paramyxoviridae* auf und kodiert für die sechs Strukturproteine N, P, M, F, G und L (Abb. 3). Zwischen den einzelnen Genen befinden sich die konservierten intergenischen Regionen (Wang et al., 2000). Am 3' Ende befindet sich die für die Replikationsinitiation notwendige *leader*-Sequenz. Dieser Promotor ist der Ausgangspunkt für die Synthese der Positiv-Strang-RNA. Ausgangspunkt für die Synthese der Negativ-Strang-RNA ist die am 5' Ende liegende *trailer*-Sequenz, die des Weiteren die Signalsequenzen für die Verpackung der RNA in die Viruspartikel während des *assembly* enthält (Walpita und Peters, 2007).

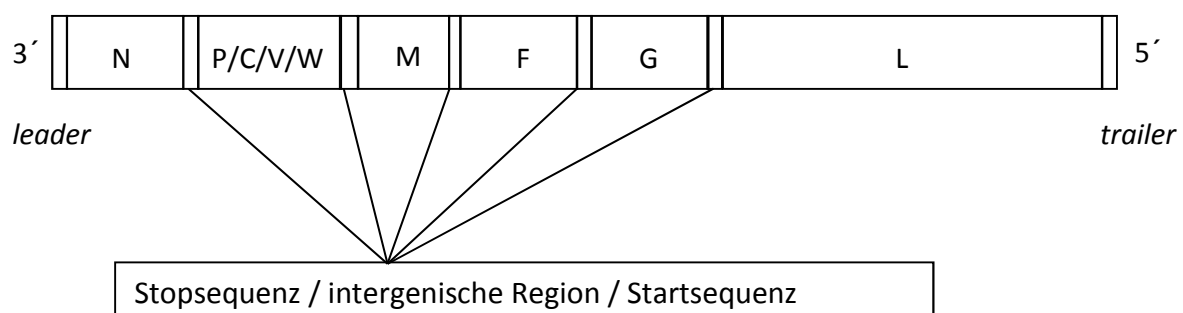


Abb. I.5: Genomorganisation des NiV. N: Nukleoprotein; P: Phosphoprotein; M: Matrixprotein; F: Fusionsprotein; G: Glycoprotein; L: Polymerase (nach Harcourt et al., 2000).

Mit einer Genomgröße von 18,2 kb unterscheidet sich das NiV deutlich von anderen Vertretern der Unterfamilie der Paramyxovirinae mit nur 15,1-15,9 kb. Verantwortlich hierfür sind das P-Gen, welches etwa 100 Nukleotide länger ist als bei anderen P-Proteinen von Mitgliedern dieser Unterfamilie und die langen untranslatierten Regionen (UTR's) am 3' Ende der einzelnen Gene.

I.1.6 Replikationszyklus

Untersuchungen mit einem Minigenom-Replikationssystem und Analysen des Genomaufbaus deuten darauf hin, dass der Replikationszyklus des NiV dem der anderen Paramyxoviren ähnelt (Halpin et al., 2004). Somit beginnt der Replikationszyklus mit der Bindung des Glykoproteins G an den zellulären Rezeptor Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 (siehe Abb. I.6). Das NiV-F vermittelt dann die pH-neutrale Fusion von Virushülle und Wirtsmembran und in Folge wird das Nukleokapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt (Tamin et al., 2002). Im Zytoplasma der Zelle wird das virale Genom in mRNA transkribiert. Am Promotor der 3' *leader*-Region kommt es zur Zusammenlagerung des viralen Polymerasekomplexes bestehend aus der Polymerase L sowie dem N- und P-Protein. Es folgt die Synthese einer kurzen *leader*-RNA, deren Funktion allerdings noch nicht bekannt ist. Dann wird das N-Gen transkribiert bis der Polymerasekomplex das Stopp- und Polyadenylierungssignal erreicht hat, die intergenische Region wird anschließend übersprungen und am Startkodon des nächsten Gens erfolgt dann die weitere Transkription. So werden alle Gene abgelesen (Leppert et al., 1979). Während der Transkription bildet sich ein mRNA-Gradient von N zu L aus (Glazier et al., 1977; Modrow et al., 2003), da die Transkriptionsinitiation nach der intergenischen Region nicht immer erfolgreich verläuft, der Polymerasekomplex dann von der RNA abfällt und wieder von vorne am 3' Promotor abliest. Der Gradient spiegelt sich auch in der gebildeten Proteinmenge wieder. Die Translation der N-, P-, M- und L-Proteine erfolgt im Zytoplasma an freien Ribosomen während die Transmembranproteine G und F am rauen ER synthetisiert werden und über den anterograden Transport zum Golgi-Apparat und weiter zur Plasmamembran gelangen. Während des Transports erfolgt die Glykosylierung der Proteine. Das F-Protein erreicht die Zelloberfläche in seiner ungespaltenen Form, wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose wieder internalisiert und im endosomalen Kompartiment durch die Cysteinprotease

Cathepsin L oder B gespalten (Vogt et al., 2005; Diederich et al., 2005; Pager und Dutch, 2005; Pager et al., 2006; Diederich et al., 2012). Anschließend wird das F-Protein in seiner fusionsaktiven Form wieder zurück zur Plasmamembran transportiert. Sind ausreichende Mengen an N-Protein im Zytoplasma vorhanden so erfolgt der Wechsel von Transkription (mRNA-Synthese) zu Replikation (Antigenom-Synthese). Hierbei kommt es durch die Interaktion des N-Proteins mit dem Polymerasekomplex zur Antitermination, das bedeutet, dass die Polymerase die intergenische Regionen überliest und ein durchgängiges Antigenom gebildet wird, welches als Matrize für die neuen Virusgenome dient. Die neuen Genome werden direkt vom N-Protein enkapsidiert und an welches wiederum das P- und L-Protein binden. Nach Synthese aller Virusproteine und der Bildung neuer Virusgenome findet das *assembly* an der Plasmamembran statt. Hierbei vermittelt das M-Protein die Interaktion zwischen dem helikalen Nukleokapsid und den zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteinen. In einem letzten Schritt erfolgt die Ausstülpung der Plasmamembran und letztlich die Freisetzung der neuen Virionen, das *budding* (Modrow et al., 2003).

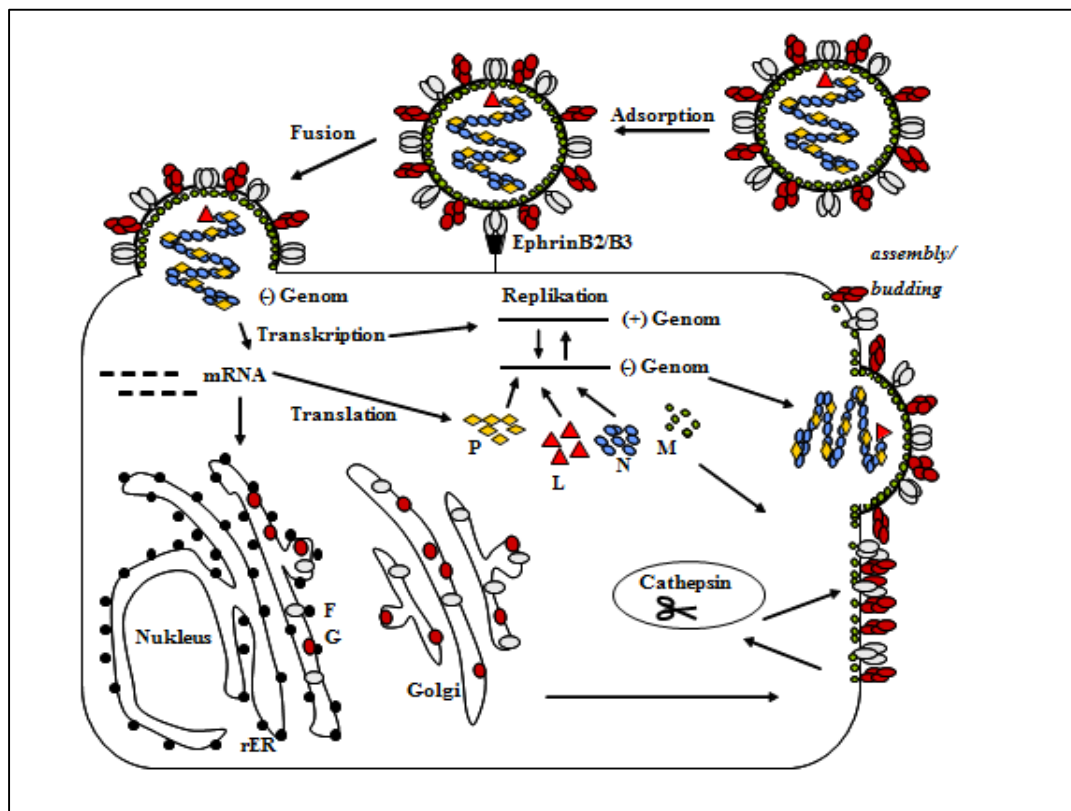


Abb. I.6: Darstellung des NiV-Replikationszyklus.

I.2. Bronchiale Epithelzellen

I.2.1. Aufbau und Funktion von Epithelzellen

Epithelzellen (EpC) bilden eine enggepackte Zellbarriere aus, welche den Organismus vor äußeren Einflüssen schützen soll. Alle Organe, welche in Kontakt zur Umwelt stehen, wie z.B. der Respirationstrakt, werden von einer Schicht aus Epithelzellen ausgekleidet. Neben dem mechanischem Schutz als Barriere vor dem Eindringen von Pathogen sind sie aber auch dafür verantwortlich, dass Immunzellen nicht stetig stimuliert werden und so das Immunsystem nicht im Dauerzustand aktiviert ist. Sie bilden somit eine wichtige Abgrenzung des Körpers gegen körperfremde Gefahren. Diesen Schutz können die EpC unter anderem durch ihren Aufbau gewährleisten. Die Plasmamembran von Epithelzellen ist aufgrund der Ausbildung von *tight junctions* (TJ) in zwei Domänen unterteilt (apikale und basale Domäne). Diese beiden Domänen unterscheiden sich in Bezug auf ihre Protein- und Lipidzusammensetzung (Rodriguez-Boulán et al., 1989, Simons et al., 1990). In direktem Kontakt zum äußeren Milieu steht die nach außen gerichtete apikale Membrandomäne. Zur Oberflächenvergrößerung sind hier oftmals Ausstülpungen wie Microvilli oder primäre Zilien vorhanden, um die Austauschfläche mit dem umgebendem Milieu zu vergrößern (Cao et al., 2012). Die basolaterale Membrandomäne hingegen ist notwendig für den Kontakt zu benachbarten Zellen, welcher durch die Ausbildung von Desmosomen, *adherens junctions* und *gap junctions* gewährleistet wird und somit die Zell-Zell-Kommunikation ermöglicht. Weiterhin sind an der basalen Seite Hemidesmosomen vorhanden, welche die Anhaftung der Epithelzellen an die Basal-Lamina sichern. Die Ausbildung der TJ verhindert die Vermischung der beiden Membrandomänen und auch den parazellulären Transport (Cao et al., 2012).

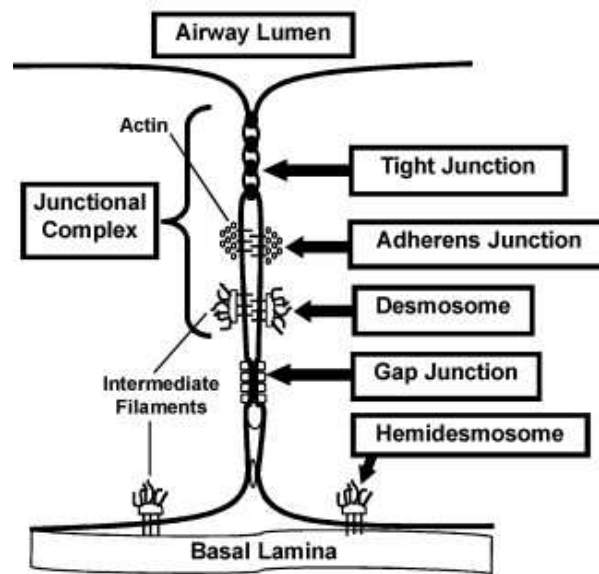


Abb. I.7: Schematischer Aufbau des *junction*-Komplexes in Epithelzellen (aus Bérubé et al., 2010).

I.2.2 Die Lunge als wichtiger Abwehrpunkt gegen Pathogene

Die komplette respiratorische Fläche der Lunge beträgt 120 m^2 (Burri et al., 2011), damit bildet dies eine enorme Angriffsfläche für Pathogene um in den Körper zu gelangen. Verschiedene Abwehrmechanismen des Körpers sind allerdings vorhanden, damit keine Krankheitserreger auf diesem Weg den Körper befallen können. Pro Tag atmet ein durchschnittlicher Mensch 10000-12000 l Luft, in der sich neben umweltbedingten Abgasen auch pilzlichen Sporen, Bakterien, Viren und Allergene befinden können (Wright et al., 2005; Trompette et al., 2009). Um all diesen Einflüssen entgegen wirken zu können, sind verschiedene Abwehrmechanismen notwendig. Als erstes bildet der komplexe Aufbau der Lunge bereits einen Schutz, deshalb ist der Aufbau der Lunge zunächst kurz zu erläutern (Abb. I.8, nach Bérubé et al. 2010). Der untere Teil des Respirationstraktes (*lower RT*, Abb. I.8) beginnt mit der durch Knorpel stabilisierten Trachea. Die Trachea mündet in den rechten und linken Hauptbronchus. Auf beiden Seiten der Lunge erfolgt dann die weitere Verästelung in die Nebenbronchien, Lappenbronchien und Segmentbronchien bis in tieferen Geweben zu den Bronchiolen (kleinste Verzweigung der Bronchien). Die Bronchiolen verzweigen sich nun wieder in noch kleiner Verästelungen, den Bronchioli respiratorii. Diese wiederum enden mit dem Lungenbläschen (Alveolen), den Zellen, die den Gasaustausch

vermitteln. Der Gasaustausch wird dadurch gewährleistet, dass die alveolären Zellen über ihre basale Membran mit Endothelzellen fusioniert sind.

Die gesamte Lunge ist mit einer Schicht aus Epithelzellen überzogen, dabei sind verschiedene Zelltypen für unterschiedliche Funktionen notwendig. Entlang des Respirationstrakts ist eine unterschiedliche Zusammensetzung der Epithelschicht vorhanden. So befinden sich in der Trachea hauptsächlich Mukus-produzierende Becherzellen, Zilien-tragende Zellen und basale Zellen. Die Produktion von Mukus führt zu einer zähflüssigen Schutzschicht, welche sich über die ganze Fläche der Epithelschicht legt. Der sekretierte Mukus enthält unter anderem antimikrobische Peptide, welche dazu dienen eventuell pathogene Mikroorganismen abzutöten bzw. so zu schwächen, dass sie nicht mehr in den Körper gelangen können. Um den Mukus aus der Lunge zu entfernen ist der synchronisierte Zilienschlag der Zilien-tragenden Zellen notwendig, welcher den Mukus von tiefergelegenen Lungenabschnitten in die Hauptbronchien, bzw. in die Trachea befördert, wo er dann abgehustet werden kann. Wird dieser Schutzmechanismus z.B. durch Influenzavirus-induzierten Zelltod verringert, so kann es zu schwerwiegenden bakteriellen Infektionen kommen (Review Hasenberg et al., 2013).

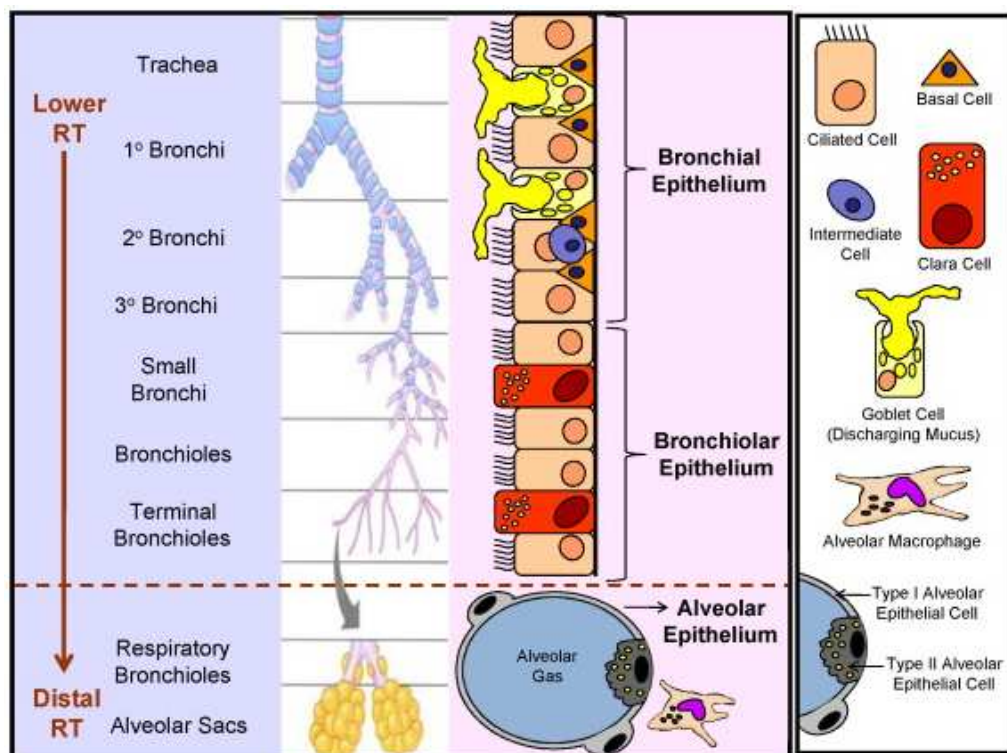


Abb.I.8: Schematischer Aufbau einer menschlichen Lunge (aus Bérubé et al., 2010).

I.2.3 Vorteile bei der Verwendung von primären Epithelzellen gegenüber permanenten Zelllinien

In dieser Arbeit wurden ausschließlich primäre Epithelzellen verwendet. Als Definition für diese Zellen gilt, dass sie direkt aus Körperflüssigkeiten oder aus Körpergeweben entnommene Explantate von vielzelligen Organismen sind (Stellungnahme des ZKBS zur Einstufung genetischer Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten 2009). Im Laufe der letzten Jahre wurden für viele wissenschaftliche Gebiete vermehrt primäre Zellen verwendet. Zunächst sah man in der Verwendung von primären Zellen den Vorteil bei der Reduktion von Tierversuchen. Damit die Arbeiten trotzdem so nah wie möglich am natürlichen Organismus lagen, konnten keine permanenten Zelllinien genutzt werden. Bei immortalisierten Zelllinien handelt es sich zumeist um Tumorzellen, was bedeutet, dass sie ein andersartiges Verhalten haben. In bestimmten Tumorzelltypen werden unterschiedliche Moleküle, wie z.B. Rezeptoren auf der Zelloberfläche hoch bzw. runter reguliert. Bei Untersuchungen von Medikamenten kann es dadurch zu Nebenwirkungen kommen, welche unter natürlichen Bedingungen nicht so aufgetreten wären. Ein Beispiel dafür wurde 2008 von Balharry und Kollegen beschrieben. Sie untersuchten die Auswirkung von verschiedenen Giften auf permanente und primäre Zellen und stellten dabei fest, dass sie sich unterschiedlich verhalten. Dabei untersuchten sie die Auswirkung von verschiedenen Toxinen aus Zigarettenrauch auf die permanenten Zellen und verglichen sie mit der Reaktion von primären Zellen auf diese Gifte. Sie konnten feststellen, dass die primären Zellen wesentlich resistenter auf die verwendeten Toxine reagierten (Balharry et al., 2008).

Die Vorteile von permanenten Zellen liegen eindeutig in der Dauer der Verwendung. Mehrere, manchmal bis zu 100, Passagen können mit diesen Zellen vorgenommen werden. Die zur Verfügung stehende Menge ist also enorm. Ein weiterer wichtiger Punkt sind die relativ günstigen Nährmedien und Zusätze. Für die Kultivierung von primären Zellen, sind teure Zusätze, wie rekombinante Wachstumshormone und andere Stimulanzen notwendig. Trotzdem ist der Gebrauch von primären Zellen in Zukunft von größter Notwendigkeit, denn die primären Zellen, sind in der Lage einen ausdifferenzierten Phänotyp zu zeigen. Dies ist von entscheidender Wichtigkeit, wenn man sich zum Beispiel zoonotische Viren, wie Influenza betrachtet. Matrosovich et al. (2004), konnten zeigen, dass im humanen Respirationstrakt unterschiedliche Zelltypen von unterschiedlichen Influenza-Stämmen infiziert werden. Für diese Experimente verwendeten sie HTBE (humane tracheo-bronchiale

Epithelzellen), welche unter Air-liquid-interface (ALI)-Bedingungen gewachsen sind. Das bedeutet, dass die Zellen auf poröse Filtermembraneinsätze ausgesät wurden und nach Erreichen einer 100 % igen Konfluenz nur noch mit Medium von der basalen Seite versorgt wurden. Nach 6-12 Wochen hatten die Zellen einen ausdifferenzierten Phänotyp erreicht, welcher durch Zilienschlag und Mukusbildung lichtmikroskopisch erkennbar war. Diese Methode ist ein hilfreiches Werkzeug um unter in vitro-Konditionen nahezu in vivo-Bedingungen zu simulieren. Matrosovich et al. konnten somit deutlich den unterschiedlichen Zelltypismus von verschiedenen Influenza-Stämmen nachweisen.

Wichtig zu erwähnen beim Umgang mit primären Zellen ist zudem auch, dass man immer in Betracht ziehen muss, dass übertragbare Krankheiten enthalten sein können. Deshalb ist es notwendig nach jeder Isolation die Zellen auf bestimmte Krankheitserreger zu untersuchen, um nicht falsche Ergebnisse zu erhalten. Da die hier verwendeten primären Zellen aus Schweinen aus veterinärmedizinischen Beständen gewonnen wurden, werden sie als Risikogruppe 1 behandelt (Stellungnahme des ZKBS zur Einstufung genetischer Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten 2009) und müssen nur auf Kontamination mit Bakterien untersucht werden.

I.3 Bedeutung der Wirtsproteasen Cathepsin B und Cathepsin L

I.3.1 Funktion, Biosynthese und Bedeutung

Der Begriff Cathepsin kommt aus dem Griechischen und bedeutet „verdauen“ oder „zerkochen“. Cathepsine sind Endopeptidasen und hydrolysieren Peptidbindungen im Inneren von Proteinen. So bauen sie intrazelluläre oder endozytierte Proteine im endosomalen/lysosomalen Kompartiment unspezifisch ab (*bulk proteolysis*). Für das Cathepsin B (CTSB) ist zusätzlich noch eine Exopeptidaseaktivität beschrieben (Aronson und Barrett, 1978; Kos et al., 2005).

Die Cathepsine teilt man anhand der AS in ihrem aktiven Zentrum in Aspartat- (z.B. Cathepsin D und -E), Serin- (z.B. Cathepsin A und G) oder Cysteinproteasen ein (Barrett, 1994). Die Cysteinproteasen stellen dabei die größte Gruppe unter den Cathepsinen dar und machen einen Großteil der lysosomalen Proteasen aus. Einige von ihnen werden ubiquitär exprimiert, wie zum Beispiel Cathepsin B, -C, -L oder -O, oder sie treten zell- bzw.

gewebsspezifisch auf, wie Cathepsin K oder -S (McGrath, 1999; Turk et al., 2000; Reinheckel et al., 2001; Rawlings et al., 2006).

Neben ihrer Beteiligung am unspezifischen Abbau von Proteinen haben Cathepsine weitere, teils sehr spezifische Aufgaben bei physiologischen und pathologischen Prozessen. Sie spielen eine Rolle bei der Aktivierung von Wachstumsfaktoren, der Prozessierung von Antigenen und sind in die Zellzykluskontrolle involviert (Brix et al., 2001; Linke et al., 2002; Rudensky und Beers, 2006; Zavasnik-Bregant und Turk, 2006; Brix et al., 2007). Zudem sind Cathepsine an der Auslösung der Apoptose beteiligt (Turk et al., 2002). Durch Hochregulation und vermehrte Freisetzung von bestimmten Cathepsinen in Tumoren, kann die extrazelluläre Matrix abgebaut werden und in Folge dessen kommt es zur Metastasierung (Jedezsko und Sloane, 2004; Mohamed und Sloane, 2006). Deshalb deuten hohe Cathepsin-Level im Plasma auf Tumorzellen hin und sind ein schlechter prognostischer Marker (Gocheva und Joyce, 2007; Nomura und Katunuma, 2005). Cathepsine sind auch bei anderen Krankheiten wie Alzheimer, Arthritis und über 30 weiteren bekannten Stoffwechselerkrankungen involviert (Baici et al., 2005; Mueller-Steiner et al., 2006). Cathepsine werden als inaktive Proenzyme am rER synthetisiert und es erfolgen posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung und Mannose-6-Phosphorylierung im Golgi-Apparat, und es wird der weitere Transport in die späten Endosomen bzw. Lysosomen gewährleistet. Der hier vorherrschende saure pH-Wert bewirkt die Trennung des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors vom Liganden und der Rezeptor wird *recycled*. Zudem kommt es zu einer Konformationsänderung der Proenzyme, die Prodomäne wird autokatalytisch oder unter Mitwirken anderer Proteasen abgespalten. Nun liegen die Cathepsine aktiv vor und können ihre vielfältigen Funktionen erfüllen (Kirschke and Barrett, 1987). Abschließend bleibt zu erwähnen, dass Cathepsine nicht nur im endosomalen Kompartiment, sondern auch außerhalb der Zellen als löslich Proteasen oder in Verbindung mit der Plasmamembran stehend vorkommen (Moin et al., 2000; Friedrichs et al., 2003; Jane et al., 2006; Brix et al., 2007).

I.3.2 Bedeutung von Cathepsin B und L für die virale Infektion

Für verschiedene Viren konnte die Bedeutung einzelner Cathepsine für die Infektion gezeigt werden. Vor allem die beiden ubiquitär exprimierten Proteasen Cathepsin B und Cathepsin L

scheinen eine entscheidende Rolle zu spielen. So wurde gezeigt, dass beide Proteasen beim Viruseintritt des Ebolavirus, nicht aber des Marburgvirus, in die Wirtszelle beteiligt sind (Gnirß et al., 2012). Sie ermöglichen eine weitere Proteolyse des Glykoproteins und erhöhen damit dessen Fusionspotenzial (Chandran et al., 2005; Kaletsky et al., 2007; Schornberg et al., 2006). Weiterhin aktiviert Cathepsin L das *Spike*-Protein des SARS-Coronavirus (CoV) und anschließend kann die Fusion der Virushülle mit der Wirtsmembran erfolgen (Huang et al., 2006; Bosch et al., 2008). Bei Reoviren vermitteln Cathepsin B und Cathepsin L als *uncoating*-Faktoren den Abbau des Nukleokapsids, dadurch wird das Genom in das Zytosol der Wirtszelle freigesetzt (Ebert et al., 2002; Akache et al., 2007). Gleiches gilt für Cathepsin L im Replikationszyklus des Virus der Japanischen Enzephalitis (Mori et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cathepsin B eine wichtige Rolle bei einer Dengue Virus (DENV) Infektion hat. Hier wird durch DENV die lysosomale Membran permeabilisiert, was in der Freisetzung von Cathepsin B in das Zytosol resultiert. Anschließend erfolgt die Induktion der Apoptose durch Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 durch freigesetztes Cathepsin B (Morchang et al., 2013). Wie schon erwähnt, wurde für die Henipaviren Cathepsin L als Aktivierungsprotease des F-Proteins beschrieben (Pager und Dutch, 2005; Pager et al., 2006). In unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings gezeigt werden, dass Cathepsin B in MDCK-Zellen die proteolytische Aktivierung des Fusionsproteins vermittelt (Diederich et al., 2012). Im Gegensatz zum Ebola und dem SARS-CoV erfolgt die Aktivierung des NiV-F nicht während des Viruseintritts sondern noch vor dem *assembly* und somit werden infektiöse neue Virionen freigesetzt (Diederich et al., 2008).

I.4 Die Nipahvirus-Rezeptoren Ephrin B2 und Ephrin B3

Wie bereits beschrieben ist das NiV in der Lage verschiedene Säugerspezies zu infizieren. Dafür ist es notwendig, dass das NiV einen Rezeptor für seinen Eintritt in die Wirtszelle verwendet, welcher in vielen Säugern exprimiert wird. 2005 wurde von zwei unabhängigen Gruppen Ephrin B2 als Rezeptor für NiV beschrieben (Bonaparte et al., 2005; Negrete et al., 2005). In einigen Regionen des Stammhirns wird Ephrin B2 allerdings nicht exprimiert, trotzdem ist bekannt, dass diese Regionen mit NiV infiziert werden (Negrete et al., 2007). Auf Zellen, welche kein funktionelles Ephrin B2 auf der Oberfläche exprimieren, kann NiV als Alternativ-Rezeptor Ephrin B3 verwenden (Negrete et al., 2006).

Ephrin B2 und Ephrin B3 sind Typ-I-Membranproteine und fungieren als Liganden für Ephrin-Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Review Pernet und Lee 2012). Die Ephrin (Eph)-Rezeptoren (erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma) stellen die größte Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) dar. Sie werden aufgrund ihrer Ligandenbindung in die Unterklassen A (EphA1-A10) und B (EphB1-EphB6) unterteilt (Wilkinson, 2001; Kullander und Klein, 2002, Xi et al., 2012). Es gibt zwei Unterklassen der Ephrin-Liganden, Ephrin A und Ephrin B. Vertreter der Ephrin A-Liganden (Ephrin A1-Ephrin A6) sind über ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellmembran verankert. Im Unterschied dazu besitzen die Ephrin B-Liganden (Ephrin B1-Ephrin B3) eine Transmembrandomäne. Kommt es zur Bindung des jeweiligen Liganden an seinen Rezeptor so kommt es zu dem sogenannten *bidirectional signalling*. Diese Signalgebung ist in verschiedenen physiologischen Prozessen wichtig, z.B. beim *embryonic patterning*, der Entwicklung des Nervensystems und der Angiogenese. Da diese Prozesse in nahezu allen Säugern stattfinden, sind die Eph-Rezeptoren und die Ephrine nicht nur in fast allen Säugerspezies vorhanden, sie sind zudem auch noch hoch konserviert (siehe Tabelle I.3; Bossart et al., 2008).

Tab. I.3: Ephrin B2- und Ephrin B3-DNA und Aminosäure-Sequenz Vergleiche von verschiedenen Säugetieren (nach Bossart et al., 2008). Vergleich bezieht sich auf das humane Ephrin B2 bzw. Ephrin B3, Angaben in Prozent.

	Ephrin B2		Ephrin B3	
	DNA	Aminosäure	DNA	Aminosäure
Mensch	100	100	100	100
Schwein	95	96	95	97
Pferd	95	96	95	98
Katze	94	96	93	97
Hund	93	96	95	97
P. alecto	94	95	94	97
Maus	91	96	91	95

I.4.1 Aufbau der Eph-Rezeptoren und der Ephrin-Liganden

Der Aufbau beider Unterklassen der Eph-Rezeptoren ist ähnlich. Sowohl EphA als auch EphB-Rezeptoren sind über eine Transmembran-Domäne in die Zellmembran verankert. Die extrazelluläre Region der Eph-Rezeptoren besteht aus zwei Fibronectin TypIII repeats, gefolgt von einer Cystein-reichen Domäne. Zum Schluss folgt eine Liganden-binde Domäne, welche auf den jeweiligen Liganden abgestimmt ist und somit die Spezifität der Ligandenbindung festlegt. Intrazellulär befindet sich die Kinase-Domäne, gefolgt von einem sterilen α -Motiv (SAM-Motiv) und abschließend die PDZ-Bindedomäne (Kullander und Klein, 2002). Die Ephrin-Liganden unterscheiden sich in ihrem Aufbau. Zwar besitzen beide in ihrer extrazellulären Domäne eine Eph-Rezeptorbinde Domäne, welche auch für die Membranverankerung verantwortlich ist. Jedoch haben nur die Ephrin B-Liganden eine zytoplasmatische Domäne, in der eine PDZ-Bindedomäne lokalisiert ist (Flanagan und Vanderhaeghen, 1998, Song et al., 2002).

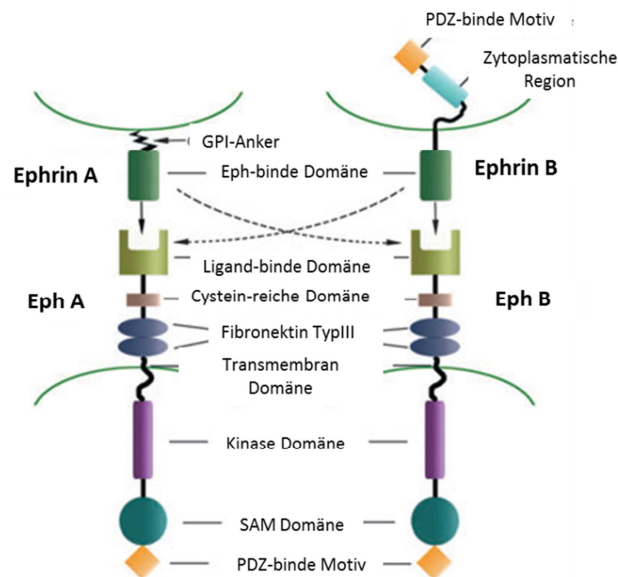


Abb.I.9: schematischer Aufbau von Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden (nach Xi et al., 2012).

Sind Eph-Rezeptoren und ihre Liganden auf der Oberfläche von gegenüberliegenden Zellen exprimiert so interagieren sie in *trans* und es kann ein sogenanntes *bidirectional signalling* stattfinden. Sind beide auf derselben Zelle vorhanden, dann kann hier die Interaktion in der *cis*-Form erfolgen, allerdings kommt es dann nicht zur Aktivierung des Signalweges (Egea und Klein, 2007). Erfolgt die Bindung der Eph-Rezeptoren mit ihren Liganden, dann bilden sie

Heterotetramere und es kommt zur Initiation des Signals. Durch die Zusammenlagerung der Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Domäne und zur Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosin-Reste. Diese wiederum aktivieren Adaptorproteine (z.B. GTPasen der Rho-Familie), welche dann *downstream* davon Signalwege aktivieren und das Signal somit in die Zelle vermitteln (*forward signalling*). Aber auch in der Zelle, welches Ephrin auf der Oberfläche exprimiert, werden Signalwege aktiviert (*reverse signalling*, Bruckner et al., 1997). Da Mitglieder der Ephrin A-Unterfamilie keine zytoplasmatische Domäne besitzen geht man davon aus das hier die Zusammenlagerung der Ephrine, welche durch die Bindung an den Rezeptor vermittelt wird, regulatorische Adapter-Proteine rekrutiert werden, welche dann das Signal in die Zelle weiter vermitteln (Davy et al., 1999). Das *reverse signalling* durch die Ephrin B-Unterfamilie wird durch das intrazelluläre PDZ-Bindemotiv gewährleistet.

I.4.2 Die physiologische Funktion von Ephrinen

Die Ephrin-Liganden und Eph-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen. Durch die Bindung von Ligand und Rezeptor während der Angiogenese wird die Ausbildung von Gefäßen vermittelt. Hier ist die besondere Stellung von EphB4 und Ephrin B2 zu erwähnen. Der EphB4-Rezeptor bindet ausschließlich Ephrin B2. Ephrin B2 ist nur auf arteriellen Endothelzellen zu finden, aber nie auf venösen Endothelzellen. Auf diesem Zelltyp findet man nur EphB4. Sind beide, EphB4-Rezeptor und Ephrin B2, auf gegenüberliegenden Endothelzellen vorhanden, dann vermittelt die Bindung das benötigte Signal zur Ausbildung von Gefäßen während der Angiogenese (Wang et al., 1998; Gale et al., 2001; Heroult et al., 2006; Korff et al., 2006).

Weiterhin sind die Ephrine wichtig bei der Entwicklung des Nervensystems (Neurogenese), vor allem bei der Axon-Orientierung (Tessier-Lavigne 1995). Aber nicht nur während der Entwicklung spielen Ephrine und Eph-Rezeptoren eine wichtige Rolle. Auch in adulten Organismen werden Ephrine und die Eph-Rezeptoren exprimiert, aber oftmals in wesentlich geringeren Leveln als im embryonalen Stadium (Herath und Boyd, 2010). Dies gilt allerdings nur für gesundes Gewebe. Denn auch bei der Entstehung von Tumoren ist die Ephrin-Expression von entscheidender Bedeutung. Es wird eine Hochregulation von Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden in vielen Tumorarten, wie z.B. Brust-, Darm- oder auch Prostatakrebs

beschrieben (Review Xi et al., 2012). Auch hier müssen neue Gefäße entstehen, welche den Tumor mit Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Sauerstoff versorgen müssen (Xi et al., 2012, Folkman 1990). Die Runterregulation von Eph-Rezeptor Levels kann effizient das Tumorstadium im Tiermodell hemmen, deshalb könnten Eph-Rezeptoren und die Ephrin-Liganden ein neuer Angriffspunkt in der Antikrebs-Therapie darstellen.

I.5 Fragestellung

Im Unterschied zu den meisten anderen Paramyxoviren weist NiV einen sehr breiten Wirtstropismus auf. Dabei zeigt es in verschiedenen Säugetier-Wirten deutliche Unterschiede in der Pathogenität und in der Virusübertragung. In NiV-infizierten Schweinen verursacht das Virus eine schwere respiratorische Infektion und kann über Aerosole oder Tröpfchen sehr effizient auf andere Säuger und Menschen übertragen werden. Im Menschen wiederum löst das NiV nur selten eine klinische respiratorische Erkrankung aus, sondern verursacht in der Regel eine schwere Infektion des ZNS, was meist eine fatale Enzephalitis zur Folge hat. Im Menschen wird NiV nur in Einzelfällen über respiratorische Sekrete ausgeschieden. Die Unterschiede in der Pathogenese und der Übertragbarkeit von NiV in Schweinen und Menschen weisen stark auf Unterschiede in der Fähigkeit des Virus hin, im Respirationstrakt dieser beiden Spezies zu replizieren. Während in mehreren Studien der natürliche Verlauf einer NiV-Infektion in Schweinen und Menschen ausführlich beschrieben ist, gibt es bislang keine vergleichende Infektionsstudien in Zellen oder Gewebekulturen aus den beiden Spezies, die Hinweise auf Wirtsfaktoren geben könnten, die den Zelltropismus und die Effizienz der Virusausscheidung beeinflussen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll nun mit Hilfe primärer Epithelzellkulturen untersucht werden, welche molekulare Mechanismen und zelluläre Faktoren für die Unterschiede in der Infektion respiratorischer Epithelzellen von Schweinen und Menschen verantwortlich sind. Wichtige Faktoren, die über die Effizienz einer NiV-Infektion in einer Wirtszelle entscheiden, sind einmal die Menge an Virusrezeptoren (Ephrine). Außerdem ist die Fähigkeit einer Wirtszelle fusionsaktives NiV F-Protein zu erzeugen essentiell für die erfolgreiche Replikation im Epithelgewebe. Diese Fähigkeit hängt sowohl von einer effizienten Endozytose des F-Proteins als auch vom Vorhandensein zellulärer Aktivierungsproteasen (Cathepsine) ab. Verschiedene Infektions- und Transfektionsexperimente in primären Bronchialepithelzellkulturen sollen letztendlich

Aufschluss geben, warum die NiV-Infektion im Respirationstrakt von Schweinen und Menschen unterschiedlich verläuft und welche Faktoren dafür verantwortlich sind, dass sich die Virusausscheidung in respiratorischen Sekreten beim Schwein und in infizierten Menschen so maßgeblich unterscheidet.

II Ergebnisse

II.1 Etablierung von primären Bronchial-Epithelzellen als Modellsystem

II.1.1 Nachweis von Epithelzell-spezifischen Markerproteinen mittels Immunfluoreszenz-Analysen

Um die NiV-Infektion von Atemwegs-Epithelzellen verschiedener Säugerspezies unter möglichst natürlichen Bedingungen untersuchen zu können, wurden für alle folgenden Experimente primäre Epithelzellen (EpC) verwendet. Dafür wurde zunächst ein Protokoll zur Isolierung von bronchialen Epithelzellen aus Schweinelungen etabliert. Um sicher zu stellen, dass es sich bei den isolierten bronchialen Zellen (**porcine bronchial epithelial cells**: PBEpC) um reine Epithelzellkulturen handelt, erfolgten verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern, die gegen spezifische Epithelzell-Markerproteine gerichtet sind, wie z.B. das Intermediärfilament Zytokeratin, welches ausschließlich von Epithelzellen exprimiert wird. Lässt man die Zellen auf *Transwell*-Filtern wachsen, polarisieren sie und es kommt zur Ausbildung von *tight (TJ)*- und *adherent junctions (AJ)*. Je nach Zelltyp bestehen diese Verschluss (*TJ*)- bzw. Ankerverbindungen (*AJ*) zwischen Nachbarzellen aus unterschiedlichen Proteinen. In Epithelzellen ist spezifisch die Ausbildung von ZO-3 (*TJ*) und E-Cadherin (*AJ*) beschrieben (Inoko et al., 2003).

Für den Nachweis des epithelialen Charakters wurden die Zellen auf Costar-*Transwell*-Filtern (12well, 4 µm Porengröße) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, danach wurden die Zellen alle zwei Tage mit frischem Medium versorgt. Nach ca. 6-8 Tagen wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 4 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton-X-100 permeabilisiert. Als nächstes erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers. Da Intermediärfilamente jeweils aus einem sauren und einem basischen Zytokeratin bestehen, wurden zwei Antikörper, zum einen gegen saure Zytokeratine und zum anderen gegen basische Zytokeratine (Pan-Zytokertin, beide aus Maus, im Verhältnis 1:1), verwendet. Außerdem wurden die Zellen mit Antikörpern inkubiert, welche gegen ZO-3 (aus Kaninchen) und E-Cadherin (aus Maus) gerichtet waren. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer (siehe Methoden V.3.8) bei 4 °C für 2 h. Die Filter wurden im Anschluss dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und es folgte die Zugabe der Alexa-Fluor (AF)-gekoppelten Zweitantikörper (anti-Maus-IgG-AF 488 zum Nachweis von Zytokeratin und E-Cadherin; anti-Kaninchen-IgG-

AF 568 zum Nachweis von ZO-3). Abschließend wurden die Zellen, wie unter V.3.8 beschrieben, mit Mowiol eingedeckelt.

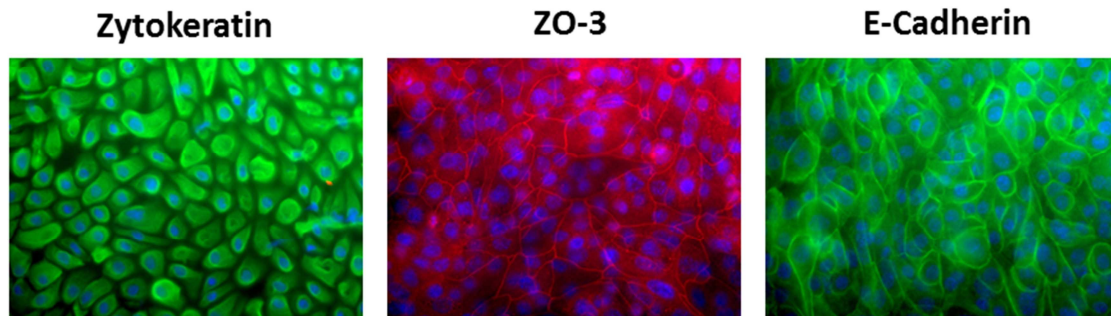


Abb. II.1: Nachweis von Epithelzell-spezifischen Markerproteinen in den isolierten Bronchial-Epithelzellen (PBEpC). Die Zellen wurden 6 Tage nach dem Aussäen auf Costar-*Transwell*-Filter mit 4 % PFA fixiert. Im Anschluss erfolgte die Permeabilisierung mit 0,2 % Triton-X-100. Die Zellen wurden für 2 h mit primären Antikörpern entweder gegen Zytokeratin (Mausantikörper gegen saure und basische Zytokeratine, 1:1, jeweils 1:10), gegen ZO-3 (aus Kaninchen, 1:10) oder gegen E-Cadherin (aus Maus, 1:10) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der AF-gekoppelten Zweitantikörper: anti-Maus-IgG-AF 488 (1:250) zum Nachweis von Zytokeratin und E-Cadherin; anti-Kaninchen-IgG-AF 568 (1:250) zum Nachweis von ZO-3. Anschließend wurden die Filter in Mowiol eingedeckelt und am inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M ApoTome, Fa. Zeiss) betrachtet.

In den isolierten Zellen konnte die Expression von Zytokeratin, ZO-3 und E-Cadherin nachgewiesen werden (Abb. II.1). Da alle drei getesteten Proteine ausschließlich von Epithelzellen synthetisiert werden, konnte eine Kontamination mit z.B. Fibroblasten somit ausgeschlossen werden. Um mehr Zellen für die Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurde versucht die Zellen zu passagieren. Für das Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurde das speziell für primäre Zellen entwickelte Passagekit 4 (ProViro) verwendet. Die Zellen wurden einmal mit dem beigefügten PBS gewaschen, dann erfolgte die Zugabe von 2 ml *detachment solution* (für eine 25 cm²-Flasche). Nach ca. 10 min bei 37°C waren alle Zellen abgelöst und es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 260 x g für 7 min. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in AEGM (*Airway Epithelial Growth Medium*, PromoCell) aufgenommen und die Zellen auf Costar-*Transwell*-Filter ausgesät. Nach ca. 5 Tagen hatten die Zellen auf den Filtern eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht. Unter dem Lichtmikroskop waren keine morphologischen Auffälligkeiten zu sehen. Um zu gewährleisten, dass die passagierten Zellen noch den epithelialen Charakter besitzen, wurde jede Zell-Passage mittels Zytokeratin-Immunfluoreszenz untersucht. Insgesamt konnten die PBEpC viermal passagiert werden, ohne ihre Epithel-Charakteristika zu verlieren (Abb. II.2).

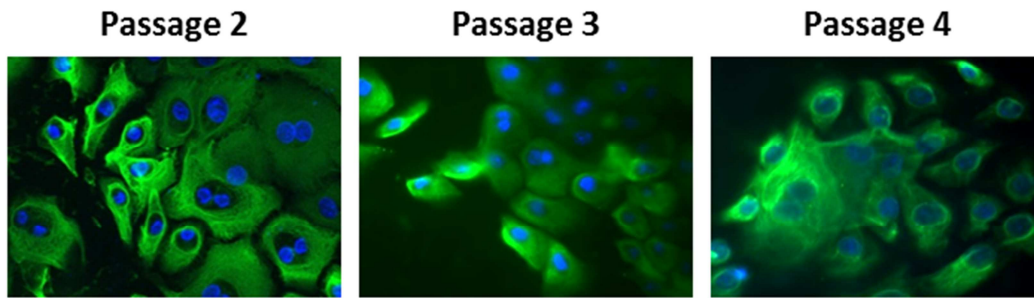


Abb. II.2: Nachweis der Zytokeratin-Expression nach mehrmaligem Passagieren der primären PBEpC. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht hatten, wurden sie mit dem Passagekit 4 der Firma ProVitro abgelöst und auf Costar-*Transwell*-Filter ausgesät. Wenn die Zellen auf den Filtern eine Konfluenz zwischen 70 - 80 % erreicht hatten, erfolgte der Nachweis der Zytokeratin-Expression mittels Immunfluoreszenz (vgl. Abb. II.1). Dabei wurden die PBEpC bis zur vierten Passage untersucht.

Für die Studien der NiV-Infektion in humanen, respiratorischen Epithelzellen wurden kommerziell erhältliche primäre bronchiale Zellen (HBepC) von der Firma ProVitro (Berlin) verwendet. Auch diese Zellen wurden zunächst mittels indirekter Immunfluoreszenz, wie bereits für PBEpC beschrieben (vgl. Abb. II.1), auf verschiedene Markerproteine getestet (Abb. II.3).

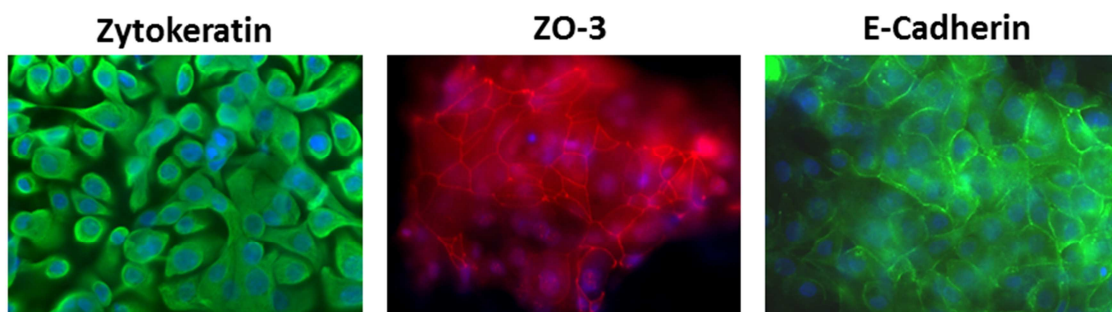


Abb. II.3: Nachweis von Epithelzell-spezifischen Markerproteinen in den kommerziell erhältlichen humanen Bronchial-Epithelzellen (HBepC). Die auf Filter ausgesäten Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert und die Permeabilisierung erfolgte mit Triton-X-100. Die Zellen wurden mit primären Antikörpern gegen saure und basische Zytokeratine, ZO-3 und E-Cadherin für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit AF-gekoppelten Zweitantikörpern. Die Auswertung erfolgte am inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M ApoTome, Fa. Zeiss).

Auch hier waren alle untersuchten Proteine nachweisbar. Das bedeutet, dass es sich bei den gekauften EpC um eine reine Epithelzellkultur handelt. Somit eignen sich diese Zellen für Vergleichsstudien der NiV-Infektion von humanen und porcinen Zellen.

II.1.2 Effekt von TNF α auf die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 und das *tight junction*-Protein Occludin

Nachdem mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde, dass in den aus Schweinelungen isolierten Bronchial-Epithelzellen (PBEPc) keine Kontamination mit anderen Zelltypen (z.B. Fibroblasten) vorhanden war, sollte nun untersucht werden, ob sich diese Zellen durch TNF α stimulieren lassen. Für verschiedene bronchiale Epithelzellen ist beschrieben, dass sie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf ihrer Zelloberfläche nach Stimulation mit proinflammatorischen Proteinen wie TNF α (Tumornekrosefaktor α) oder Interferon γ hochregulieren können (Rosseau et al., 2000). Diese Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Transmigration von Leukozyten durch das Epithelium bei einer Entzündung. Vor Beginn der NiV-Infektionsstudien sollte deshalb zunächst sichergestellt werden, dass sich die isolierten porcinen Bronchial-Epithelzellen im Zellkultursystem „physiologisch“ verhalten, das heißt sich durch TNF α stimulieren lassen. Deshalb wurden die Zellen mit rekombinanten TNF α stimuliert, im Anschluss die RNA isoliert und eine quantitative *Real-Time* PCR (qPCR) mit Hilfe von spezifischen Primern gegen die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 durchgeführt. Als Negativkontrolle diente das *tight junction* Protein Occludin, welches nicht durch TNF α hochreguliert wird (Cui et al., 2010).

Die auf Filtern gewachsenen PBEPc wurden ca. 5 Tage nach dem Aussäen mit TNF α stimuliert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und durch neues Medium, welches rekombinantes TNF α (ProSpec; 100 ng/ml) enthielt, ersetzt. Die Zugabe erfolgte sowohl von der apikalen als auch von der basalen Seite. Nach einer Inkubationszeit von 1 bzw. 4 h wurden die Zellen mittels RLT-Puffer (1:10 versetzt mit β -Mercaptoethanol, β -ME) lysiert. Im Anschluss erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA mittels RNeasy®-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop Spectrophotometer gemessen und auf ihre Reinheit untersucht. Als nächstes erfolgte die Reverse Transkription mittels *random hexamer*-Primern. Für die anschließende qPCR wurden 100 ng cDNA pro Reaktion eingesetzt. Die Durchführung der qPCR erfolgte mittels *SYBR Green* Mastermix

(Fermentas) und spezifischer Primer gegen ICAM-1, VCAM-1 und Occludin. Als interne Kontrolle wurde α -Tubulin verwendet. Diese wird zur Normierung verwendet um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen.

Um zu kontrollieren, dass bei der qPCR nur das gewünschte spezifische Produkt amplifiziert wurde, wurde nach der PCR noch ein Schritt in den PCR-Ablauf gefügt, der eine Schmelzkurven-Berechnung ermöglicht (siehe V.1.7). Für die Auswertung der qPCR bedient man sich des C_t -Wertes. Dabei beschreibt der C_t -Wert, ab welchem Zyklus der PCR die Fluoreszenz, welche durch Bindung von *SYBR Green* an doppelsträngige DNA entsteht, das erste Mal über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Je größer die Ausgangsmenge an mRNA im Zelllysat ist umso größer ist die anteilige Menge an cDNA pro 100 ng Reaktionsansatz. Je mehr cDNA vorhanden ist desto mehr doppelsträngige DNA wird neu amplifiziert und umso früher steigt die Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz. Das bedeutet, mit zunehmender mRNA-Menge wird der C_t -Wert kleiner.

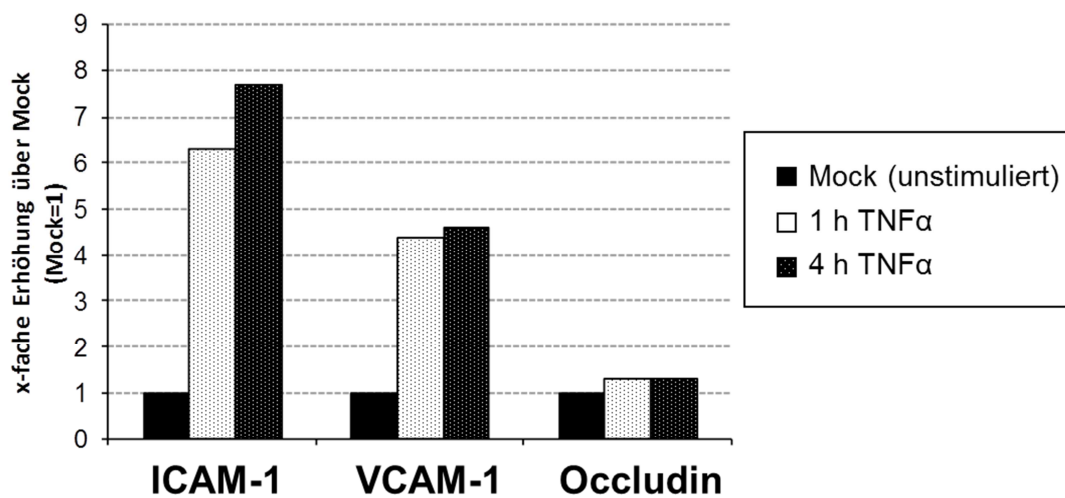


Abb. II.4: qPCR-Nachweis von ICAM-1, VCAM-1 und Occludin nach TNF α -Stimulation. PBEPc wurden auf Transwell-Filter (Costar, 12 wells) für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die PBEPc sowohl apikal als auch basal für 1 h bzw. 4 h mit rekombinantem Schweine-TNF α (100 ng/ μ l) stimuliert. Im Anschluss wurde die RNA mittels RNeasy-Kit (Qiagen) isoliert und mit Hilfe von *random hexamer*-Primern und Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgte mittels *SYBR Green*-Methode die qPCR mit spezifischen Primern gegen ICAM-1, VCAM-1 und Occludin. Als Kontrolle diente α -Tubulin. Für die Darstellung der x-fachen Erhöhung über Mock wurde die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Berechnung gewählt (siehe Methoden V.1.8).

Wie in der Abb. II.4 zu sehen ist, sind die PBEPc in der Lage auf die TNF α -Stimulation mit einer Hochregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 zu reagieren und es ist kein Effekt auf die „Negativkontrolle“ Occludin nachweisbar. Damit wird deutlich, dass das hier etablierte Zellkultursystem adäquat mit der Hochregulation von ICAM-1 und VCAM-1 reagieren kann und somit als Modell-System zur Untersuchung der NiV-Infektion von bronchialen Epithelzellen geeignet ist.

II.2 Infektion von primären porcinen und humanen Bronchial-Epithelzellen

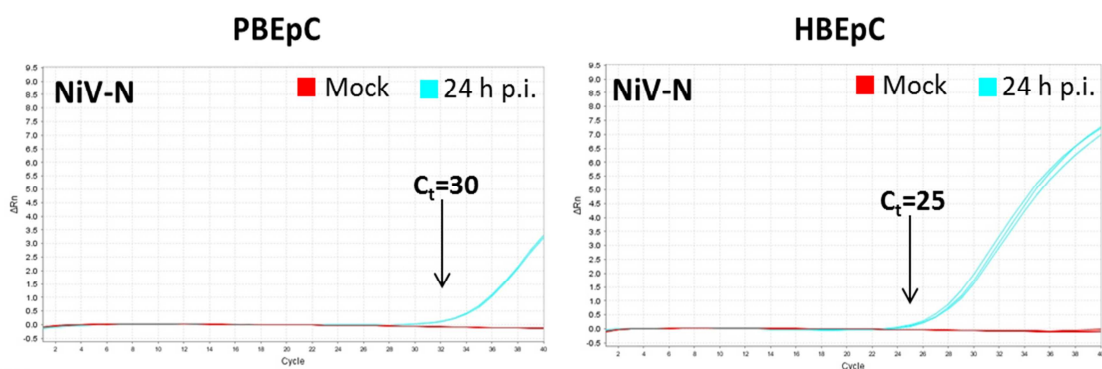
II.2.1 Infektion von subkonfluenten und polarisierten Epithelzellkulturen

Nachdem die porcinen und humanen bronchialen EpC ausreichend charakterisiert waren, sollten die Zellen unter BSL4-Bedingungen mit NiV infiziert werden. Die erfolgreiche Infektion wurde mit drei verschiedenen Methoden nachgewiesen. Einmal erfolgte der Nachweis von infizierten Zellen durch Immunfluoreszenz-Analysen mit einem polyklonalen anti-NiV-Serum, welches verschiedene NiV-spezifische Proteine erkennt. Außerdem wurde die Infektion durch qPCR nachgewiesen, wobei NiV-N-spezifische RNA aus Zelllysaten quantifiziert wurde. Weiterhin wurde der Virustiter als Maß für die erfolgreiche Virus-Freisetzung mit Hilfe der TCID₅₀-Methode quantifiziert.

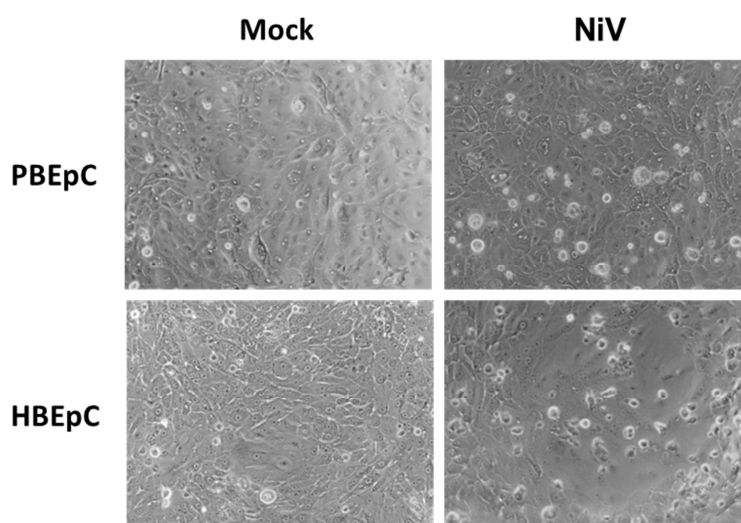
Für die Infektionsstudien wurden die porcinen und humanen Epithelzellen auf Costar-*Transwell*-Filtern ausgesät und kultiviert bis sie eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht hatten. Im Sicherheitslabor wurden die Zellen mit einer MOI von 0,5 infiziert. 24 h nach der Infektion (*post infectionem*, p.i.) und 48 h p.i. wurden jeweils 300 μ l des Überstandes für die Bestimmung des Virustiters im Zellkulturüberstand abgenommen. Weiterhin wurden 24 h p.i. Durchlichtbilder gemacht, um die Synzytien-Formation zu dokumentieren. Für den Nachweis von viraler RNA in infizierten Zellen wurden die Zellen mit RLT-Puffer + β -ME für 5 min inkubiert und dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 350 μ l Ethanol (100 %) und der Überführung in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß konnten die Proben aus dem Sicherheitslabor ausgeschleust werden. Im Anschluss erfolgte die Isolation der RNA mit dem RNeasy®-Kit (Qiagen). Die RNA wurde dann mittels *random hexamer*-Primern in cDNA umgeschrieben. Die darauf folgende qPCR wurde mit spezifischen Primern gegen das Nukleoprotein und einem *SYBR Green* Mastermix durchgeführt. Um NiV-positive

Zellen mittels Immunfluoreszenz-Analyse detektieren zu können, wurden die Zellen 48 h p.i. mit 4 % PFA inaktiviert und aus dem BSL4-Labor ausgeschleust. Unter BSL2-Bedingungen wurden die Zellen gewaschen und mit DMEM-10 % FCS abgesättigt. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung durch Behandlung mit Methanol/Aceton (Met/Ac, (v/v) 1:1). Nach Inkubation mit 0,1 M Glyzin wurden die Filter mit dem anti-NiV-Meerschweinchenserum (gp 4) inkubiert. Nach 1 h bei 4 °C, wurden die Filter mit PBS⁺⁺ mehrmals gewaschen und es folgte die Zugabe eines AF 568-gekoppelten Zweitantikörpers. Um die Zellkerne detektieren zu können, erfolgte zusätzlich eine DAPI-Färbung. Die Filter wurden dann mit Mowiol eingedeckelt.

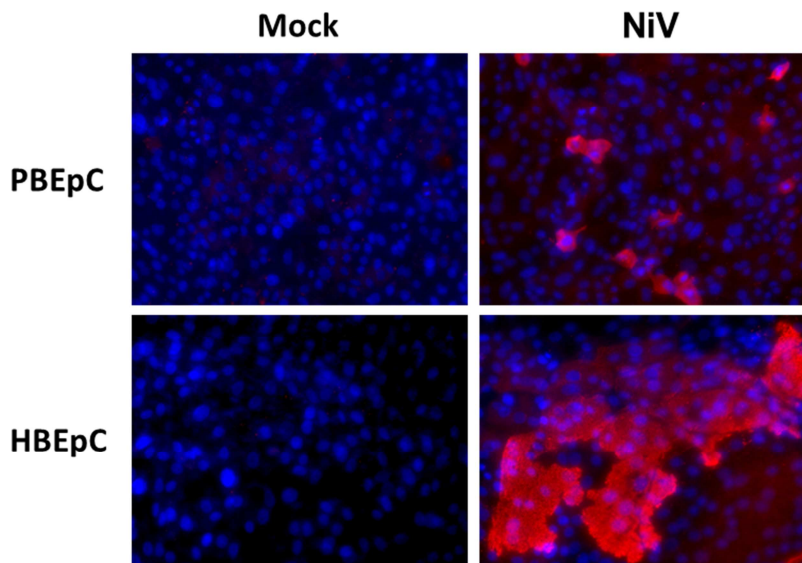
A)



B)



c)



D)

	HBEpC	PBEpC
24 h p.i.	1.1×10^7	$< 5 \times 10^2$
48 h p.i.	1.6×10^9	2.3×10^5

Abb. II.5: Vergleich der Infizierbarkeit von sub-konfluenten PBEpC und HBEpC mit NiV. PBEpC und HBEpC wurden auf *Transwell*-Filter ausgesät und mit NiV mit einer MOI von 0,5 infiziert. A) 24 h p.i. wurde die RNA aus Mock-infizierten und NiV-infizierten PBEpC und HBEpC isoliert und eine qPCR gegen das NiV-Nukleoprotein durchgeführt. B) Phasenkontrastaufnahmen der infizierten Zellkulturen zum Nachweis der Synzytienformation. C) 48 h p.i. wurden die Zellen mit 4 % PFA für 48 h fixiert, mit Met/Ac permeabilisiert und zum Nachweis der NiV-positiven Zellen mit einem anti-NiV-Serum aus Meerschweinchen (gp 4, 1:1000) und einem AF 568-konjugierten anti-Meerschweinchen IgG-Serum (1:250) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10.000) gegengefärbt. Die Filter wurden anschließend mit Mowiol eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200M) ausgewertet. D) Um die Virusfreisetzung zu quantifizieren wurde der Überstand von infizierten Zellen abgenommen (24 und 48 h p.i.) und der Titer mittels TCID₅₀-Methode bestimmt.

Alle in Abb. II.5 gezeigten Ergebnisse lassen dieselbe Aussage zu: Humane Bronchial-Epithelzellen sind effizienter mit NiV infizierbar als PBEpC. Abb. II.5.A) zeigt, dass 24 h p.i. im Zelllysat infizierter PBEpC noch keine signifikante Menge an spezifischer NiV-N-mRNA nachweisbar ist (C_t -Wert > 30). Im Gegensatz dazu ist bereits ein deutlicher Anstieg der NiV-N-mRNA in HBEpC zu detektieren (C_t -Wert = 25). Passend dazu konnten unter dem Lichtmikroskop noch keine Synzytien in den PBEpC entdeckt werden, aber in den infizierten HBEpC ist eine NiV-induzierte Synzytienformation deutlich zu sehen (Abb. II.5.B). In den durchgeführten Immunfluoreszenz-Analysen sind 48 h p.i. (Abb. II.5.C) in den NiV-infizierten

PBEpC einzelne NiV-positive Zellen zu finden. Dies zeigt, dass eine, wenn auch geringe, Infektion der Zellen stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu sind allerdings in HBEpC schon fast alle Zellen infiziert. Hier kann die Formation von sehr großen Foci detektiert werden, welche die effiziente NiV-Infektion bestätigen. Betrachtet man sich dann noch die Freisetzung von NiV aus infizierten PBEpC und HBEpC (Abb. II.5.D), so ist wie erwartet nach 24 h p.i. in den PBEpC noch keine Freisetzung messbar, während im Überstand von HBEpC bereits 1×10^7 TCID₅₀/ml nachweisbar sind. Erst 48 h p.i. ist auch im Überstand von infizierten PBEpC Virus detektierbar. Der Unterschied zum Virustiter aus HBEpC beträgt zu diesem Zeitpunkt allerdings schon 4 log-Stufen.

II.2.2 Eintritt und Freisetzung von NiV aus polarisierten Bronchial-Epithelzellen

In den Versuchen unter II.2.1 konnte bereits gezeigt werden, dass sub-konfluente humane und, wenn auch schlechter, porcine Bronchial-Epithelzellen mit NiV infiziert werden können. Im Folgenden sollte geklärt werden, wie NiV polarisierte Epithelzellen infiziert und ob es hierbei ebenfalls Unterschiede zwischen den Bronchial-Epithelzellen der beiden Spezies gibt. Hierbei sollte zunächst untersucht werden, ob die Viren einen polarisierten Epithelverband von der apikalen (*in vivo* \triangleq lumenale Seite) oder von der basolateralen Seite (*in vivo* \triangleq Gewebe-zugewandte Seite) infizieren können. Um dies zu untersuchen wurden HBEpC und PBEpC für 8 Tage auf *Transwell*-Filtern kultiviert, bis beide einen vollständig polarisierten Phänotyp ausgebildet hatten. Danach wurden die Zellen im BSL4-Labor mit NiV infiziert. Dabei wurden die einzelnen Filter entweder von der apikalen oder von der basalen Seite mit der Viruslösung inkubiert (1 h, 37 °C). Nach 24 h, 48 h und 72 h p.i. wurde zum einen der Überstand abgenommen, um den Virustiter zu bestimmen. Zum anderen wurden die Zellen mit 4 % PFA nach 72 h p.i. fixiert. Nachdem die Filter aus dem BSL4-Labor ausgeschleust wurden, konnten die NiV-positiven Zellen mittels Immunfluoreszenz-Färbungen visualisiert werden. Dafür wurden, wie zuvor unter II.2.1 beschrieben, ein NiV-spezifisches Antiserum aus Meerschweinchen (gp 4) verwendet.

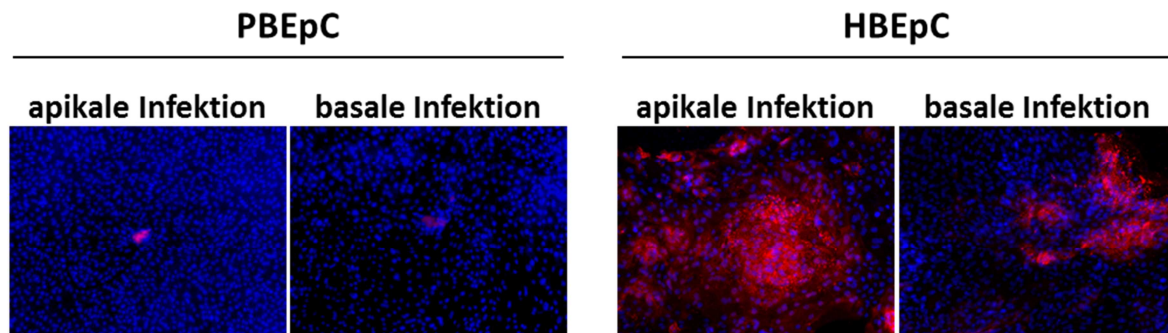


Abb. II.6: Vergleich von apikaler und basaler Infektion von PBEpC und HBEpC mit NiV. Polarisiert gewachsene PBEpC und HBEpC wurden entweder von der apikalen oder von der basalen Seite mit NiV infiziert. 72 h p.i. erfolgte die Inaktivierung mit 4 % PFA. Anschließend wurden die NiV-positiven Zellen mit 0,2 % Triton-X-100 permeabilisiert und mit einem NiV-spezifischen-Antiserum nachgewiesen wie in Abb. II.5 beschrieben.

In der Immunfluoreszenz-Analyse konnten eindeutig NiV-Proteine in den infizierten HBEpC detektiert werden (Abb. II.6). Sowohl nach apikaler als auch nach basaler Infektion sind NiV-positive Foci zu erkennen, was eine Infektion und anschließende Ausbreitung der Viren beweist. Somit lässt sich schlussfolgern, dass NiV in der Lage ist, primäre humane bronchiale Epithelzellen sowohl von der luminalen oder apikalen, aber auch von der basalen Seite zu infizieren. Im Gegensatz zu den HBEpC sind in den polarisierten porcinen Zellen 72 h nach der Infektion nur einzelne NiV-positive Zellen zu detektieren. Die Infektionsversuche in den PBEpC müssten daher mit einer höheren Infektionsdosis durchgeführt werden, um eine Aussage über die Polarität der NiV-Infektion in diesen Zellen treffen zu können.

In Abb. II.7 sind die Virustiter im apikalen und basalen Zellkulturmedium von infizierten EpC dargestellt. Die Graphen A) und B) zeigen die Ergebnisse für HBEpC. Dabei fällt auf, dass jeweils apikal deutlich mehr Virus freigesetzt wird und dass die Polarität der Virusfreisetzung unabhängig davon ist, ob die Zellen von apikal oder basal infiziert wurden. Dabei unterscheiden sich die apikalen und basalen Titer um ca. 2 log-Stufen. In PBEpC waren nur nach apikaler Infektion Viren im Zellkulturmedium nachweisbar (C). Dabei zeigte sich im Vergleich zu den HBEpC aber gar keine (48 h p.i.) bzw. nur eine leicht bessere apikale Freisetzung (72 h p.i.). Wurden die Zellen von basal infiziert, konnte selbst nach 72 h p.i. kein Titer bestimmt werden.

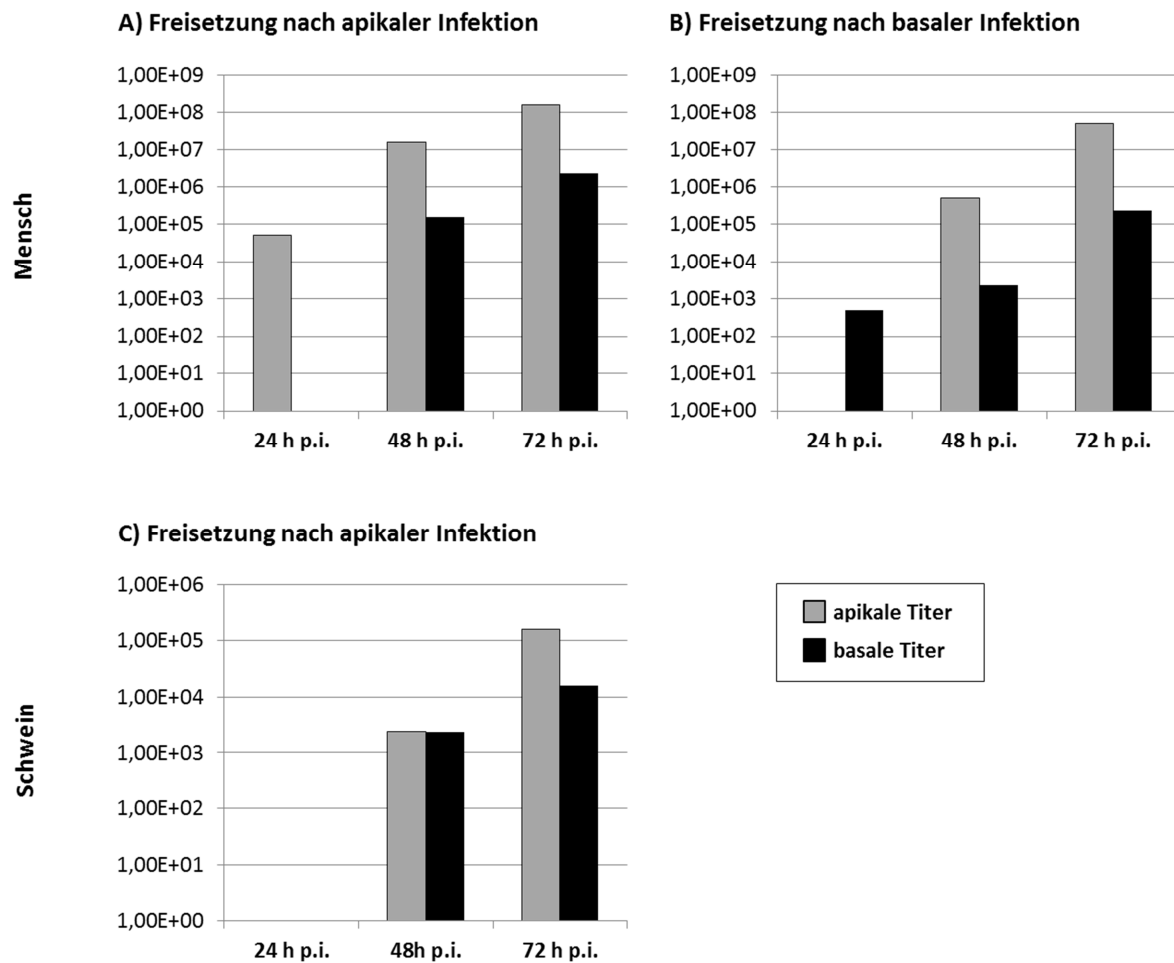


Abb. II.7: NiV-Freisetzung aus infizierten humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen. Polar auf Filtern gewachsene HBEpC und PBEpC wurden entweder von der apikalen (HBEpC A); PBEpC C)) oder von der basalen Seite (HBEpC B)) mit NiV infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (24 h, 48 h, und 72 h p.i.) wurde der Überstand abgenommen und der Virustiter mittels TCID₅₀-Methode bestimmt.

Insgesamt zeigen diese Versuche wiederum, dass die Infektion von humanen Zellen mit NiV effizienter erfolgt. Sie weisen aber auch darauf hin, dass sich die Polarität der Virusfreisetzung in den beiden Zelltypen unterscheiden könnte. Möglicherweise hängt die prädominante apikale Freisetzung von NiV aus den HBEpC, die in PBEpC nicht beobachtet wurde, mit der effizienteren (schnelleren) Vermehrung in den humanen Bronchial-Epithelzellen zusammen.

II.3 Die Rolle von Cathepsin L und B in der NiV-F-Aktivierung in Bronchial-Epithelzellen

Vergleichende Untersuchungen von NiV-Isolaten aus infizierten Schweinen und Menschen zeigten, dass es eine 100 %ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen den Virus-Isolaten gibt. Das bedeutet, dass sehr wahrscheinlich zelluläre Wirtsfaktoren verantwortlich für die unterschiedliche Ausbreitung von NiV im Respirationstrakt von Schweinen und Menschen sind. Betrachtet man, welche Prozesse im NiV-Replikationszyklus abhängig von Wirtszell-spezifischen Faktoren sind, so fallen unter anderem zwei wichtige Punkte auf. Zum einen die Rezeptor-Expression, welche eine wichtige Voraussetzung für einen erfolgreichen Virus-Eintritt ist und zum anderen Wirtsproteasen, welche notwendig sind, um das Fusionsprotein zu aktivieren. Letzteres ist essentiell für die Produktion infektiöser Viren und die Ausbreitung der Virusinfektion mittels Zell-Zell-Fusion. Abhängig vom Zelltyp können zwei unterschiedliche Proteasen für die Prozessierung des Fusionsproteins verantwortlich sein, Cathepsin L oder Cathepsin B (Pager et al., 2005; Diederich et al., 2012). Deshalb sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, welche Protease in die Spaltung des NiV-Fusionsproteins in bronchialen Epithelzellen vom Schwein und vom Menschen involviert ist.

II.3.1 Cathepsinaktivität in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Zelltypen die NiV-F Prozessierungsproteasen unterschiedlich aktiv sind (Diederich et al., 2012). Deshalb sollte die Aktivität von Cathepsin L und Cathepsin B in den primären Zellen verglichen werden.

Dafür wurden die Zellen auf Kollagen-beschichtete Costar *6-well*-Platten ausgesät bis sie eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten. Im Anschluss wurden die Zellen mit CytoBuster lysiert und der Gesamtproteingehalt der Lysate mittels Micro-BCA™-Protein-Reaktionskit bestimmt. Für jede Reaktion wurden 10 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Bestimmung der Cathepsin-Aktivitäten erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen InnoZyme™-Cathepsin L bzw. Cathepsin B-Kits und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung erfolgte am Lumineszenz-Spektrometer LS-55.

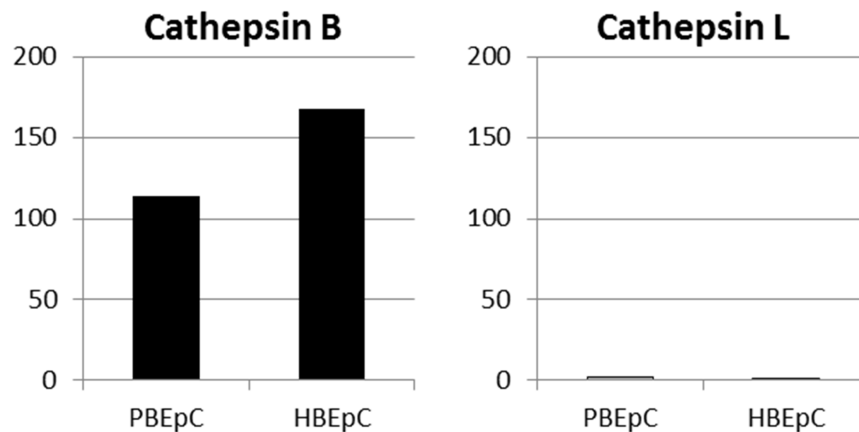


Abb. II.8: Bestimmung der Cathepsin L- und Cathepsin B-Aktivitäten in verschiedenen primären Zellen. Subkonfluente PBEpC und HBEpC wurden lysiert und 10 µg Gesamtprotein wurden pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die Cathepsin-Aktivitäten wurden mit Hilfe des InnoZyme Kits, wie unter V.3.2 beschrieben, bestimmt. Die Messung erfolgte am Lumineszenz-Spektrometer LS-55.

Vergleicht man die beiden Graphen in Abb. II.8, so stellt man fest, dass in beiden primären Epithelzellkulturen sehr viel aktives Cathepsin B nachweisbar ist. Im Unterschied dazu ist kaum Cathepsin L zu detektieren. Auffällig ist, dass es keinen deutlichen Unterschied zwischen humanen und porcinen Epithelzellen in Bezug auf die Aktivität der beiden Proteasen zu geben scheint. Die Tatsache, dass beide nur ein geringes Level an Cathepsin L aufweisen, deutet darauf hin, dass Cathepsin B wahrscheinlich die Spaltprotease in beiden primären Epithelzelltypen ist. Um zu überprüfen, ob die Spaltprotease in beiden Spezies identisch ist, wurden Cathepsin-Inhibitor-Studien durchgeführt

II.3.2 Einfluss von Cathepsin-Inhibitoren auf die F-Spaltung

Das NiV-Fusionsprotein wird am rauen ER als inaktives Vorläuferprotein F_0 synthetisiert und muss in *Recycling*-Endosomen durch die Cysteinproteasen Cathepsin L oder B in seine Untereinheiten F_1 und F_2 proteolytisch prozessiert werden (Pager et al., 2005; Diederich et al., 2012). Erst diese fusionsaktive Form des F-Proteins ermöglicht eine Infektion der Wirtszelle und im weiteren Verlauf die Synzytienausbildung und darüber hinaus die zellassoziierte Ausbreitung des Virus. Frühere Arbeiten zeigten, dass die NiV-F Spaltung in unterschiedlichen Zelllinien mit sehr verschiedenen Effizienzen stattfinden kann (Moll et al., 2004; Diederich et al., 2007; Altmeppen, 2008; Sauerhering, 2009). Um die Spalteffizienz in

den primären Zellen zu testen, wurden PBEpC und HBEpC nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 70-80 % mit dem Plasmid pCAGGS-NiV-F-tag transfiziert. Dieses Plasmid kodiert für NiV-F mit einem C-terminalen HA-tag. Über diesen HA-tag kann das F-Protein mit Antikörpern gegen den HA-tag immunpräzipitiert oder im Western Blot detektiert werden. Für die Transfektion der primären Zellen wurde das Transfektionsreagenz FuGENE-HD verwendet (siehe V.2.6).

Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion (p.t.) mit RIPA-Puffer lysiert und im Anschluss wurde das F-Protein mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen den HA-tag (H6908, aus Kaninchen) aus dem Lysat immunpräzipitiert. Die gefällten Proteine wurden in 20 µl 2x Probenpuffer (PP) mit 4 % β -ME aufgenommen und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proteine wurden anschließend in einem 12 %igen SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulose (NC)-Membran. Zur Detektion des NiV-F wurde die Membran zunächst mit einem monoklonalen anti-HA-tag-Antikörper aus Maus und anschließend mit einem anti-Maus IgG (Ziege)/IRDye 800-Antikörper gefärbt. Die so markierten Proteinbanden konnten am Odysseygerät (LiCor) ausgewertet werden. Aufgrund der Detektion des HA-tag am C-Terminus konnten nur das Vorläuferprotein F_0 (69 kDa) und das Spaltprodukt F_1 (49 kDa) nachgewiesen werden.

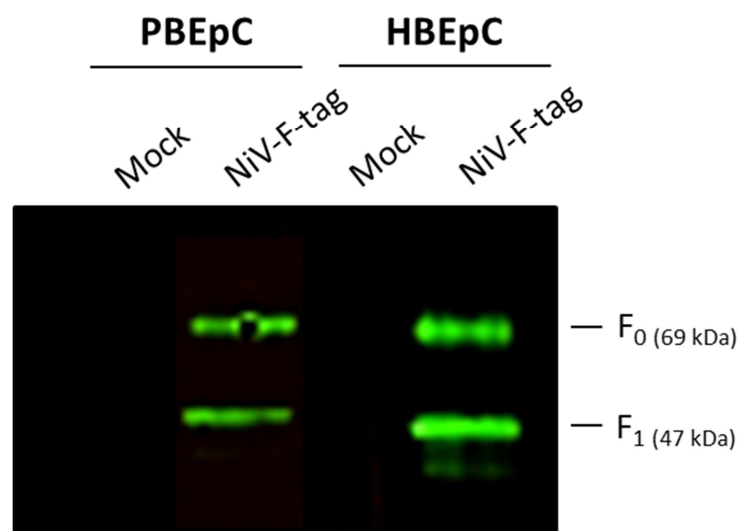


Abb. II.9: Spaltung des NiV-Fusionsproteins in PBEpC und HBEpC. Subkonfluente PBEpC und HBEpC wurden mit pCAGGS-NiV-F-tag mittels FuGENE-HD transfiziert. 17 h p.t. erfolgte eine RIPA-Lyse und anschließend wurden die F-Proteine mit einem polyklonalen anti-HA-tag-Antikörper (H6908, 1:500) aus dem Lysat immunpräzipitiert. Dann wurden die Proteine unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine NC-Membran transferiert. Die F-Proteine wurden durch Färbung mit einem monoklonalen anti-HA-tag-Antikörper (aus Maus, 1:1000) und anti-Maus-IgG (Ziege)/IRDye 800 (1:10000) nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte am Odyssey-Gerät (LiCOR).

Sowohl in humanen als auch in porcinen Bronchial-Epithelzellen ist die Prozessierung des Fusionsproteins nachweisbar. Dies ist daran zu erkennen, dass bei beiden nicht nur das ungespaltene Vorläuferprotein F_0 sondern auch das Spaltprodukt F_1 detektierbar ist. Die Quantifizierung der Spalteffizienzen (F_1/F_0+F_1) zeigte, dass es in beiden Zellspezies zu einer Spaltung von ca. 50-60 % kommt. Auch hier ist kein Unterschied erkennbar.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen die gleiche Protease (Cathepsin B) für die F-Spaltung verantwortlich ist, wurden die primären Zellen erneut mit pCAGGS-NiV-F-tag transfiziert. 6 h p.t. wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei spezifische Inhibitoren dem Medium zugesetzt wurden. Dabei handelte es sich zum einen um den kommerziell erhältlichen Cystein-Inhibitor E64d, welcher alle Cystein-Proteasen irreversibel hemmt. Zum anderen wurden die Zellen mit NS134P behandelt. Es handelt sich hier um einen Cathepsin B-spezifischen Inhibitor, der uns von Prof. Norbert Schaschke zur Verfügung gestellt wurde. Beide Inhibitoren konnten bereits in früheren Arbeiten auf ihre Spezifität und Wirksamkeit untersucht werden (Diederich et al., 2012; Sauerhering, 2009). Für die in Abb. II.10 gezeigten Inhibitorstudien wurden HBEpC und PBEpC auf Kollagen-beschichteten Costar-6well-Platten ausgesät und mittels FuGENE-HD mit dem pCAGGS-NiV-F-tag-Plasmid transfiziert. 6 h p.t. erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe der Inhibitoren, E64d (20 μ M) und NS134P (10 μ M). Beide Inhibitoren sind in DMSO gelöst. Um einen Effekt des Lösungsmittels auszuschließen, wurde der Kontrollansatz auch mit DMSO behandelt. 17 h p.t. wurden die Zellen wie in Abb. II.9 beschrieben lysiert, die F-Proteine gefällt und im Western Blot sichtbar gemacht.

In Abb. II.10 ist zu erkennen, dass die Behandlung mit DMSO keinen inhibierenden Einfluss auf die Spaltung zeigte. Betrachtet man den Effekt des Cystein-Inhibitors E64d, so ist zu beobachten, dass sowohl in humanen als auch in porcinen Bronchial-Epithelzellen keine Prozessierung des Fusionsproteins zu erkennen ist. Das bestätigt, dass auch in den primären Zellen eine Cystein-Protease die Spaltprotease für NiV-F ist. Die Behandlung mit dem Cathepsin B-spezifischen Inhibitor zeigte eine ebenso deutliche Hemmung der F-Spaltung in PBEpC und HBEpC und beweist damit, dass in porcinen und humanen Zellen Cathepsin B die verantwortliche Protease ist. In den NS134P behandelten HBEpC ist zwar keine vollständige Hemmung der F-Spaltung zu sehen wie in PBEpC, sondern nur eine Reduktion um knapp 90 %. Die noch nachweisbare restliche Spaltung ist möglicherweise darauf zurück zu führen,

dass HBEpC eine höhere Cathepsin B-Aktivität als PBEpC besitzen und deshalb die eingesetzte Menge an NS134P nicht ausreichend für eine 100 %ige Inhibition ist.

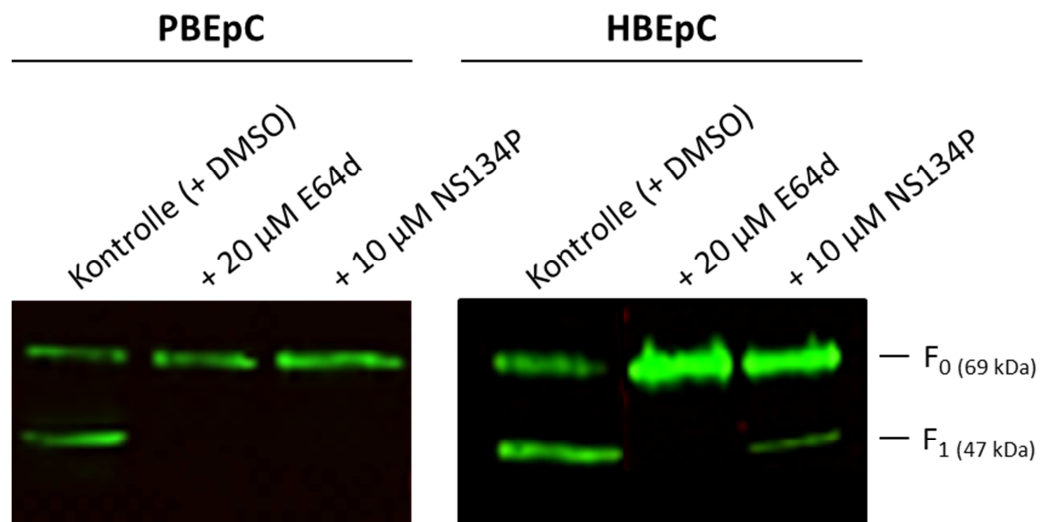


Abb. II.10 : Einfluss spezifischer Cathepsin-Inhibitoren auf die NiV-F-Spaltung. F-tag-exprimierende PBEpC und HBEpC wurden 6 h p.t. mit verschiedenen Inhibitoren behandelt und 17 h p.t. mit RIPA-Puffer lysiert. Danach wurden die F-Proteine mit einem anti-HA-tag-Antikörper (H6908, 1:500) immunpräzipitiert und unter reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine NC-Membran wurden die Proteine mit einem monoklonalen anti-HA-tag-Antikörper aus Maus (1:1000) und einem anti-Maus-IgG (Ziege)/IRDye 800 (1:10000) sichtbar gemacht. Die Detektion der fluoreszierenden F-Proteinbanden erfolgte am Odyssey-Gerät (LiCOR).

Insgesamt weisen die Ergebnisse der Cathepsin-Studien darauf hin, dass die Aktivierungsprotease sowohl in humanen als auch in porcinen bronchialen Epithelzellen Cathepsin B ist.

II.4 Expression von Wirtszellrezeptoren (Ephrine) in porcinen und humanen Bronchial-Epithelzellen

Nach den Untersuchungen zur NiV-Aktivierungsprotease wurde in diesem Teil der Arbeit die Rezeptor-Expression in den porcinen und humanen Bronchial-Epithelzellen analysiert. Unterschiede in der Ephrin B2 (EB2) - bzw. Ephrin B3 (EB3)-Rezeptorexpression könnten nämlich für die unterschiedliche Infizierbarkeit der HBEpC und PBEpC verantwortlich sein, da die Verfügbarkeit geeigneter Rezeptoren die wichtigste Voraussetzung für einen erfolgreichen Viruseintritt in die Zelle und die Zell-Zell-Fusion ist.

II.4.1 Nachweis der Rezeptorexpression durch RT-PCR und qPCR

Es wurde zunächst untersucht, ob die hier verwendeten HBEpC und PBEpC die NiV-Rezeptoren Ephrin B2 oder Ephrin B3 exprimieren. Dafür wurde eine RNA-Isolation mit anschließender RT-PCR mit spezifischen Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 Primern durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen auf Kollagen beschichteten Costar-*6well*-Platten ausgesät. 6 Tage nach dem Aussäen wurden die Zellen mittels Passage-Kit 4 abgelöst, bei 260 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml AEGM aufgenommen. Im Anschluss wurde die Zellzahl mit einer Neubauerkammer bestimmt und insgesamt 5×10^5 Zellen für eine RNA-Isolation mittels RNeasy®-Kit (QIAGEN) eingesetzt. Diese wurden in 350 µl RLT + β -ME (1:10) und 350 µl 100 % Ethanol aufgenommen. Die RNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Die RNA wurde dann für eine RT-PCR mit dem *One Step* RT-PCR Kit (QIAGEN) und spezifischen Primern gegen Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in 6xPP aufgenommen und in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt.

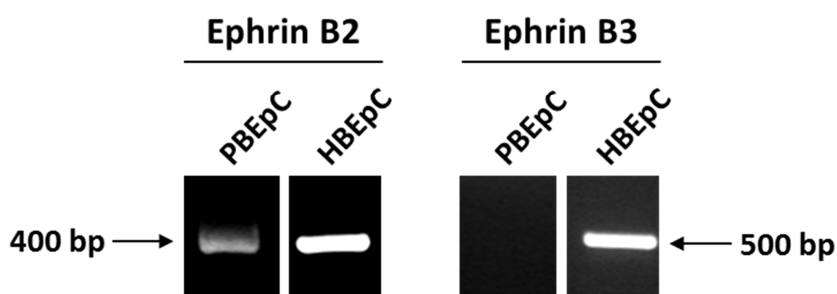


Abb. II.11: RT-PCR mit Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 spezifischen Primern. 5×10^5 PBEpC und HBEpC wurden für die RNA-Isolation mit dem RNeasy® Kit eingesetzt. Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des *One Step* RT-PCR Kits und Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 spezifischen Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden dann in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid angefärbt.

Die RT-PCR zeigt, dass in humanen und porcinen Zellen Ephrin B2-mRNA nachweisbar ist, aber nur die humanen Zellen zusätzlich auch ein spezifisches Amplifikationsprodukt für Ephrin B3 zeigen. Untersuchungen von trachealen Epithelzellen beider Spezies zeigten, dass auch hier nur in humanen Zellen Ephrin B2 und Ephrin B3 zu detektieren ist (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass nur in respiratorischen Epithelzellen von Menschen auch Ephrin B3 vorhanden ist. Um die Unterschiede in der Ephrinexpression quantitativ zu untersuchen, wurde eine quantitative qPCR durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf *6well*-Platten ausgesät und 6 Tage später in 350 µl RLT-Puffer + β -ME (1:10) abgekratzt. Die

Lysate wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 350 µl 100 % Ethanol versetzt. Im Anschluss erfolgte die RNA-Isolation mit dem RNeasy®-Kit (QIAGEN). Die Elution erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser und der Gehalt und die Reinheit der RNA wurde am Nanodrop gemessen. Die RNA wurde dann mittels *random hexamer*-Primern in cDNA umgeschrieben. Die darauf folgende qPCR wurde mit 100ng cDNA, spezifischen Primern gegen Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 und einem *SYBR Green* Mastermix durchgeführt.

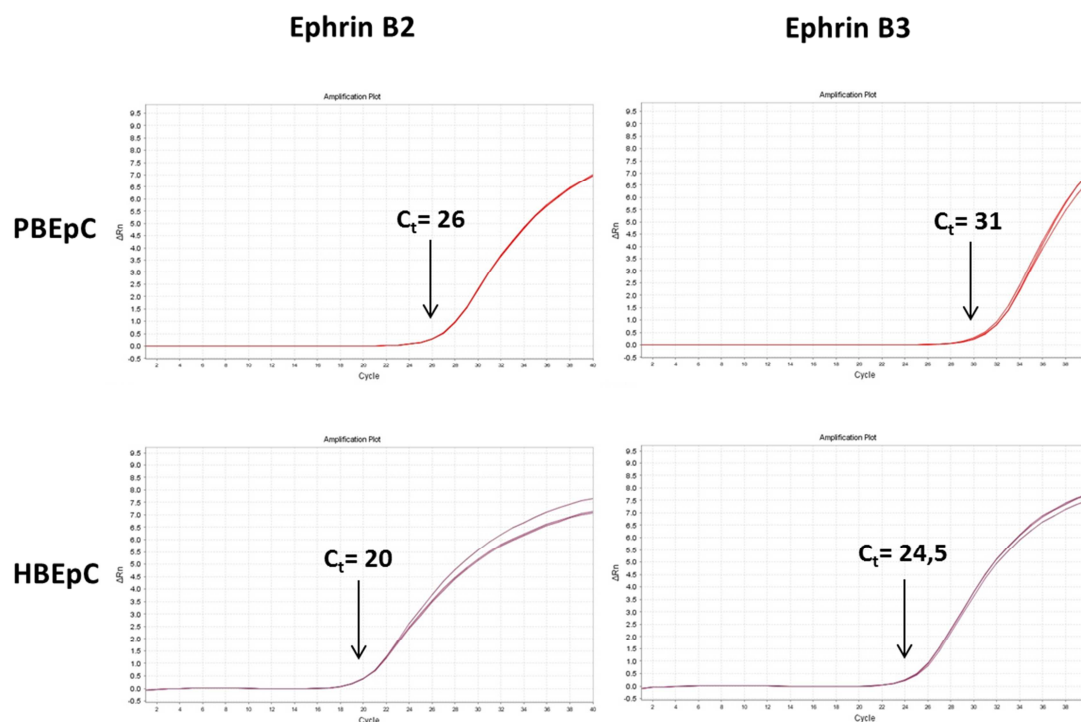


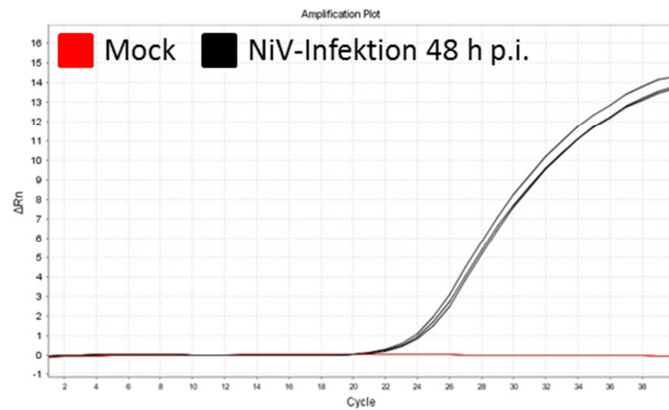
Abb. II.12: Quantitativer Vergleich der Ephrin B2- und Ephrin B3-mRNA-Level in PBEpC und HBEpC. Die gesamte RNA wurde mittels RNeasy®-Kit isoliert und anschließend via RT-PCR und *random hexamer*-Primern in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde eine quantitative qPCR mit spezifischen Primern gegen Ephrin B2 und Ephrin B3 durchgeführt.

Die Abbildung II.12 zeigt, dass HBEpC mehr Ephrin B2-mRNA enthalten. Vergleicht man die C_t -Werte für Ephrin B2 in PBEpC und HBEpC, so ist ein Unterschied von 6 C_t -Werten zu messen. Auch für Ephrin B3 ist ein Unterschied von 6,5 C_t -Werten zu erkennen. In PBEpC ist der C_t -Wert über 30, was vermuten lässt, dass hier nur sehr geringe Mengen an Ephrin B3-mRNA vorhanden sind. Der C_t -Wert für Ephrin B3 bestätigt so den fehlenden Ephrin B3-Nachweis in der RT-PCR (Abb. II.11). Insgesamt zeigt die qPCR-Analyse, dass HBEpC nicht nur

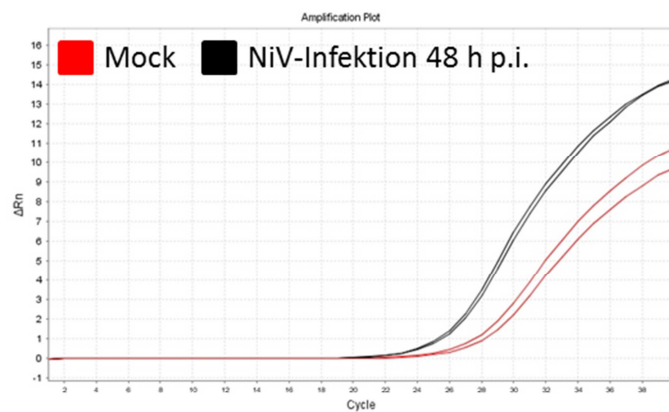
zusätzlich mRNA für Ephrin B3, sondern auch quantitativ mehr mRNA für Ephrin B2 besitzen. Dies ist somit der erste Hinweis, dass auf HBEPc mehr NiV-Rezeptoren exprimiert werden.

Um zu testen, ob die NiV-Infektion einen Einfluss auf die Ephrin B2-Level hat, wurden die Zellen auf Kollagen-beschichtete Costar-6wells ausgesät bis sie eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten. Im Anschluss wurden die Zellen mit NiV (MOI 0,5) infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 45 min bei 37 °C wurden die Zellen fünfmal mit PBS⁺⁺ gewaschen, um nicht gebundenes Virus zu entfernen. Für die Bestimmung der NiV-N und Ephrin B2-mRNA-Menge im Zelllysate wurden die Zellen mit 350 µl RLT-Puffer und 3,5 µl β-ME für 5 min inkubiert, mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 350 µl Ethanol (100 %) wurden die Zellen in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Proben aus dem Zelllysate konnten dann aus dem BSL4-Labor ausgeschleust und unter S2-Bedingungen mittels RNeasy®-Kit die RNA isoliert werden. Für den Nachweis viraler NiV-N-RNA und Ephrin B2-mRNA aus infizierten Zelllysaten wurde die gesamte RNA mittels *random hexamer*-Primern und Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurden 100 ng der cDNA pro qPCR-Reaktion eingesetzt. Betrachtet man die Kurven für Ephrin B2, so fällt als erstes auf, dass die NiV-Infektion (schwarze Kurve, C_t-Wert:25) zu einer Erhöhung der Ephrin B2-mRNA führt (4 fache Erhöhung im Gegensatz zu Mock).

NiV-N



Ephrin B2



Tubulin

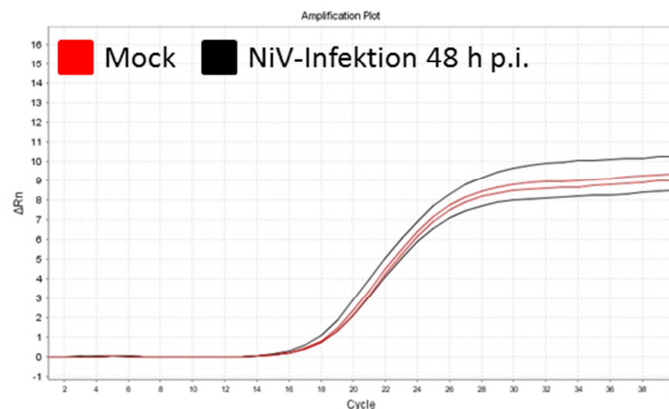


Abb. II.13: Auswirkung der NiV-Infektion auf das Ephrin B2-Level von infizierten PBEPc. PBEPc wurden auf Kollagen-beschichteten *6well*-Platten ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen im Hochsicherheitslabor mit NiV (MOI von 0,5) infiziert. Die RNA wurde 48 h p.i. aus den Zelllysaten mittels RNAeasy®-Kit isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte die qPCR mit spezifischen Primern gegen NiV-N, Ephrin B2 und als interne Kontrolle Tubulin.

Diese Ergebnisse bedeuten, dass die Infektion alleine zu einer Erhöhung der Rezeptorexpression führen kann. Da man für die qPCR die gesamte RNA von allen Zellen isoliert, ist nicht klar ob die Hochregulation von Ephrin B2 durch die NiV-Infektion in der infizierten Zellen stattfindet, oder ob durch die Infektion Zytokine freigesetzt werden, die in der gesamten Zellkultur die Ephrin B2-Expression hochregulieren.

II.4.2 Funktioneller Rezeptornachweis durch „Overlay-Fusionsassay“

Um zu testen, in wie weit die Ephrin-Rezeptoren funktionell auf der Oberfläche der HBEpC und PBEpC exprimiert werden, wurde ein „Overlay-Fusionsassay“ durchgeführt. Befinden sich die beiden NiV-Glykoproteine F und G auf der Oberfläche von NiV-infizierten Zellen oder auf Zellen, die mit den Glykoproteinen transfiziert wurden, so kommt es nur zur Zell-Zell-Fusion, wenn auf Nachbarzellen Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 vorhanden ist. Mit Hilfe eines Fusionsassays kann man deshalb nachweisen, ob Ephrin B2 oder B3 auf der Oberfläche funktionell exprimiert wird. Für einen solchen Fusionsassay kann man im einfachsten Fall die NiV-F und -G in PBEpC und HBEpC ko-exprimieren und anschließend die Synzytienbildung als Maß für die Zell-Zell-Fusion quantifizieren. Um aber auszuschließen, dass eine eventuell unterschiedliche Transfizierbarkeit bzw. Transfektionseffizienz der HBEpC und PBEpC zu unterschiedlichen Ergebnissen führt, wurden die primären Epithelzellen nicht mit NiV-F und NiV-G ko-transfiziert, sondern ein sogenannter „Overlay-Fusionsassay“ durchgeführt. Dafür wurden Ephrin-negative HeLa-Zellen auf *6wells* ausgesät und mit den beiden Glykoproteinen mittels FuGENE-HD transfiziert. Um sicher zu stellen, dass die HeLa-Zellen ausreichend NiV-F und NiV-G auf der Oberfläche exprimieren, wurden sie für 22 h bei 33 °C inkubiert. Da HeLa-Zellen kein Ephrin exprimieren, kommt es hier nicht zur Synzytienbildung. Die F- und G-exprimierenden HeLa-Zellen wurden dann mittels Trypsin abgelöst, bei 1700 rpm für 10 min abzentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml DMEM-10 % FCS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. 5×10^5 F- und G-exprimierende HeLa-Zellen wurden dann auf die adhärenenten PBEpC bzw. HBEpC gegeben und für 15 h bei 33 °C inkubiert. Ist funktionelles Ephrin auf der Oberfläche der primären Zellen vorhanden, dann kommt es beim „Overlay“ mit F- und G-exprimierenden HeLa-Zellen zur Synzytienbildung. Zur besseren Visualisierung der Zell-Zell-Fusion wurde eine GIEMSA-Färbung durchgeführt.

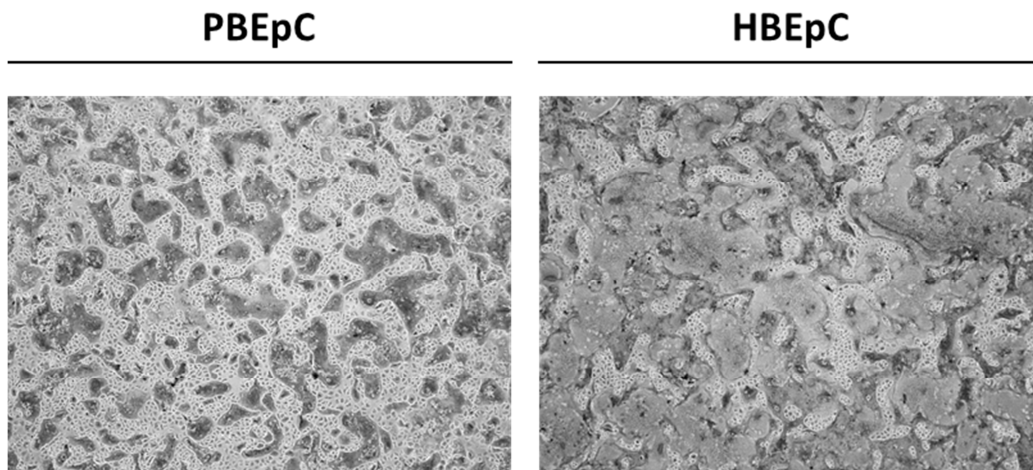


Abb. II.14: Indirekter Nachweis der funktionellen Rezeptorexpression in PBEpC und HBEpC mittels „Overlay-Fusionsassay“. Ephrin-negative HeLa-Zellen wurden mit NiV-F und -G transfiziert. 22 h p.t. wurden die Zellen abgelöst und 5×10^5 HeLa-Zellen auf PBEpC oder HBEpC gegeben („Overlay“), welche sub-konfluent auf *6well*-Platten angewachsen waren. Nach 15 h bei 33 °C erfolgte eine GEMSA-Färbung zur Sichtbarmachung der Zell-Zell-Fusion.

Wie in Abbildung II.14 zu sehen, kommt es bei dem „Overlay-Fusionsassay“ zur deutlichen Bildung von Synzytien, sowohl in PBEpC als auch in HBEpC. Das bedeutet, dass bei beiden Zelltypen genügend Ephrin-Rezeptoren auf der Oberfläche vorhanden sind, um mit den F- und G-exprimierenden HeLa-Zellen zu fusionieren. Um zu untersuchen, ob es hier zu zeitlichen Unterschieden im Fusionsverhalten kommt, wurde der „Overlay“ mit einer kürzeren Inkubationszeit (90 min statt 15 h) erneut durchgeführt.

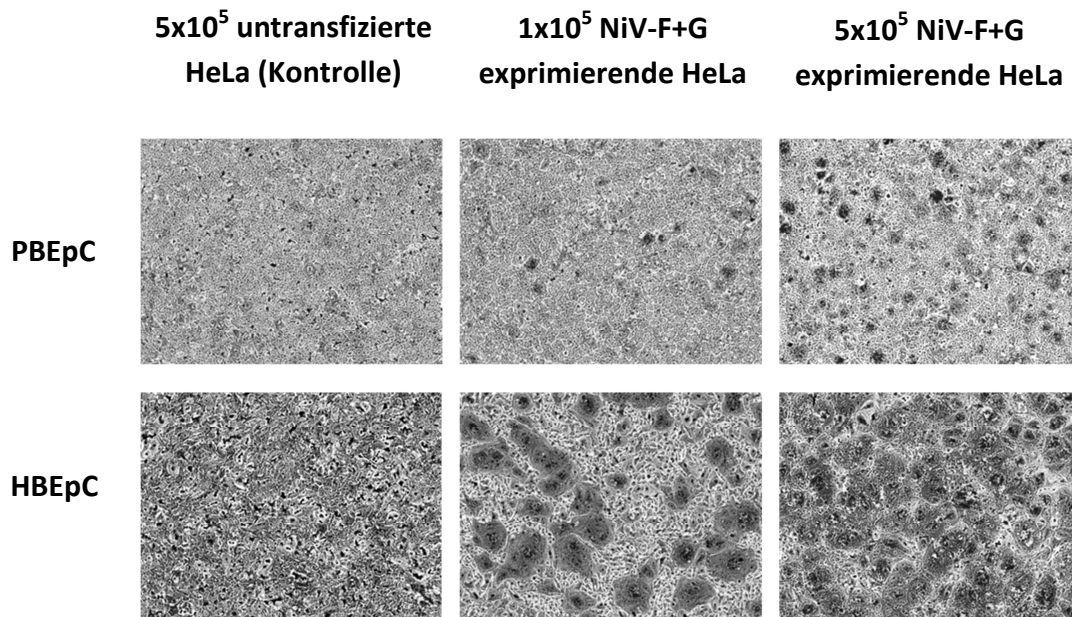


Abb. II.15: „Overlay-Fusionsassay“ von NiV-F und NiV-G exprimierenden HeLa-Zellen auf PBEpC und HBEpC. Ephrin-negative HeLa-Zellen wurden mit NiV-F und G transfiziert. 22 h p.t. wurden zwei unterschiedliche Mengen an F+G-exprimierenden HeLas (1x10⁵ und 5x10⁵) auf PBEpC oder HBEpC gegeben. 90 min nach dem „Overlay“ erfolgte eine GIEMSA-Färbung.

Bereits 90 min nach dem „Overlay“ waren in HBEpC schon viele und große Synzytien zu sehen, während es in PBEpC nur zu kleineren und weniger Synzytien im selben Zeitraum kam. Dies lässt darauf schließen, dass die humanen Bronchial-Epithelzellen mehr Ephrin besitzen, bzw. dass mehr Zellen Ephrin exprimieren. Diese Beobachtung unterstützt somit die Ergebnisse der vorherigen PCR-Analysen.

II.5 Einfluss der zusätzlichen Expression von humanen Ephrin-Rezeptoren auf die G- und F-vermittelte Fusionsaktivität und die NiV-Infektion in PBEpC

II.5.1 Überexpression von humanem Ephrin B2 in porcinen Bronchial-Epithelzellen

Die bisherigen Ergebnisse weisen deutlich auf Unterschiede in der Rezeptor-Expression in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen hin. Um zu klären, ob diese quantitativen Unterschiede tatsächlich für die bessere Infizierbarkeit von humanen Bronchial-Epithelzellen verantwortlich sind, wurden Rezeptor-Überexpressionsstudien durchgeführt. Dazu wurden zum einen Transfektions- und „Overlayassay“-Experimente durchgeführt und zum anderen

der Effekt der Ephrin-Überexpression auf die Infizierbarkeit von porcinen Epithelzellen untersucht.

II.5.1.1 Transfektion von humanem Ephrin B2 in PBEPc

Da HBEpC besser mit NiV infizierbar sind und mehr Ephrin B2 und zusätzlich Ephrin B3 besitzen, sollte humanes Ephrin B2 in PBEPc transfiziert werden, um den Effekt der Ephrin-Überexpression auf die Zell-Zell-Fusion zu untersuchen. Um nachzuweisen, dass das humane Ephrin erfolgreich in PBEPc exprimiert wird, wurde zunächst die Ephrin-mRNA mittels qPCR bestimmt.

Dafür wurden die PBEPc auf *6wells* ausgesät und mit verschiedenen Mengen an pCAGGS-EB2 (humanes EB2, Lena Thiel) mittels FuGENE-HD transfiziert. 17 h p.t. wurden die Zellen mit RLT-Puffer + β -ME (1:10) abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 100 % Ethanol und die RNA wurde mittels RNeasy®-Kit isoliert. Als nächstes wurde die gesamte RNA mittels *random hexamer*-Primern und unter Verwendung der Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die anschließende qPCR (*SYBR Green* Methode) wurden 100 ng cDNA und Ephrin B2 spezifische Primer eingesetzt.

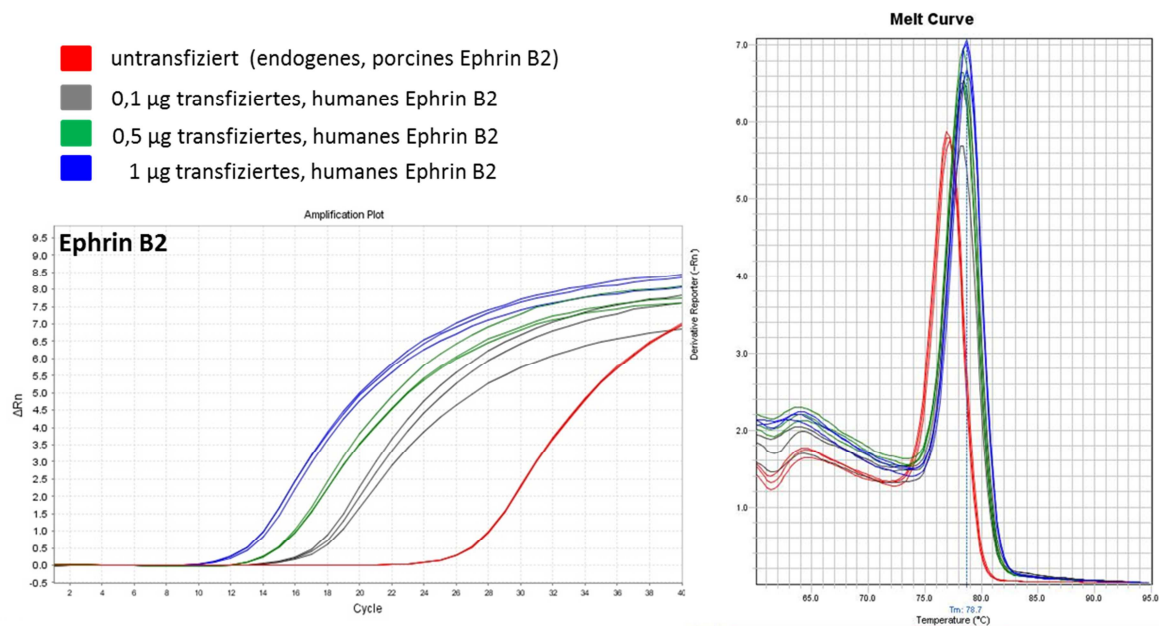


Abb. II.16: Nachweis der erfolgreichen Expression von humanem Ephrin B2 in PBEpC. PBEpC wurden mit verschiedenen Mengen pCAGGS-EB2 transfiziert (Transfektion von 0,1 µg; 0,5 µg; 1 µg). 17 h p.t. wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die qPCR wurde mit Ephrin B2-spezifischen Primern und einem SYBR Green Mastermix durchgeführt.

Abb. II.16 zeigt im Amplifikationsplot eine deutliche Erhöhung der Ephrin B2-mRNA in den transfizierten PBEpC. Abhängig von der transfizierten Menge an pCAGGS-EB2 sieht man auch eine Erhöhung der Ephrin B2-mRNA in den transfizierten Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass die Transfektion der primären Zellen mit dem Ephrin B2-kodierenden Plasmid funktioniert hat. Betrachtet man sich die Schmelzkurven, welche nach jeder qPCR durchgeführt werden, um sicher zu stellen, dass nur ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde, so fällt auf, dass zwei verschiedene Schmelztemperaturen gemessen wurden. Diese unterschiedlichen Temperaturen deuten darauf hin, dass zwei unterschiedlich große Amplifikate vorhanden sind. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass humanes und porcines Ephrin B2 nur eine 96 % Homologie in ihrer Aminosäure-Sequenz besitzen (Bossart et al., 2008). Bei den zwei Amplifikaten handelt es sich vermutlich um porcines, endogenes Ephrin B2 und um humanes, transfiziertes Ephrin B2. Die unterschiedlichen Schmelztemperaturen ermöglichen so die Differenzierung zwischen Ephrin B2, welches endogen in der Zelle vorliegt und dem zusätzlich exprimierten, Plasmid-kodierten Ephrin B2.

Um auszuschließen, dass die pCAGGS-Ephrin B2 Transfektion eine generelle unspezifische Auswirkung auf die mRNA Expression in der Zelle hat, wurden neben den Tubulinkontrollen, auch noch Ephrin B3 mittels qPCR untersucht.

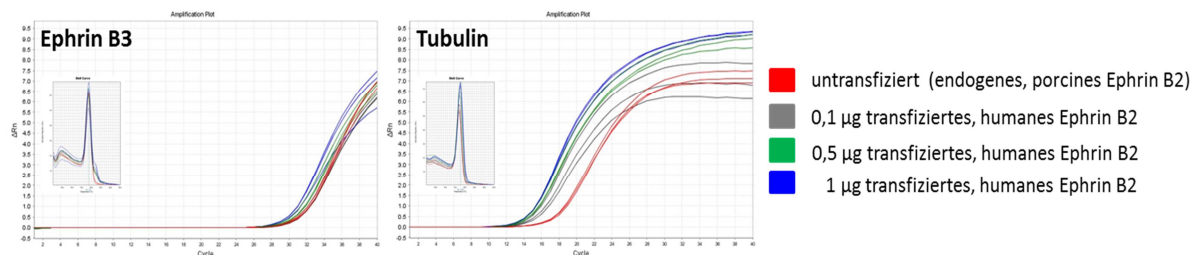


Abb. II.17: Auswirkungen der Ephrin B2-Transfektion auf die Ephrin B3- und Tubulin-mRNA. PBEpC wurden wie unter Abb. II.16 beschrieben transfiziert, die RNA isoliert und nach der cDNA-Synthese erfolgte die qPCR mit spezifischen Primern gegen Ephrin B3 und Tubulin.

Die Transfektion von humanem Ephrin B2 lässt keinen Einfluss auf die Ephrin B3-mRNA erkennen. Aber die Transfektion scheint dazu zu führen, dass Tubulin nach der Transfektion hochreguliert wird. Dies ist vermutlich ein unspezifischer Effekt der FuGENE-HD-Transfektion. Berücksichtigt man diese Hochregulation des Tubulins, so lässt sich aber trotzdem eine Erhöhung der humanen Ephrin B2-Menge in den Zellen feststellen.

II.5.1.2 Einfluss von überexprimiertem, humanem Ephrin B2 auf die Zell-Zell-Fusion

Um nun zu untersuchen, welchen Einfluss die zusätzliche Expression von humanem Ephrin B2 auf die Zell-Zell-Fusion hat, wurden zum einen „Doppeltransfektions“-Versuche durchgeführt. Dabei wurden die primären, porcinen Bronchial-Epithelzellen erst mit dem pCAGGS-EB2 Plasmid transfiziert. 4 h danach erfolgte eine weitere Transfektion mit den beiden Glykoproteinen NiV-F und NiV-G. In den dreifach transfizierten Zellen wurde dann die Synzytienbildung analysiert. In einem zweiten Versuchsansatz wurde ein „Overlay-Fusionsassay“ mit PBEpC durchgeführt, die zuvor mit pCAGGS-EB2 transfiziert wurden. Mit beiden experimentellen Ansätzen sollte geklärt werden, ob es durch die zusätzliche Expression des humanen Ephrin B2 zu einer vermehrten Synzytienbildung (Anzahl) und/oder zu einer Zunahme der Synzytiengröße in PBEpC kommt.

Für die „Doppeltransfektions“-Versuche wurden PBEpC auf Kollagen-beschichtete *6well*-Platten ausgesät und kultiviert, bis sie eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten. Dann erfolgte die erste Transfektion mit FuGENE-HD und 0,1 µg oder 0,5 µg pCAGGS-EB2-Plasmid. Um die Transfektionsversuche vergleichen zu können, muss dieselbe Menge an DNA für jeden Transfektionsansatz eingesetzt werden. Deshalb wurde im Ansatz mit 0,1 µg pCAGGS-EB2 noch zusätzlich 0,4 µg pCAGGS-eGFP transfiziert. 4 h p.t. wurde das Transfektionsgemisch abgenommen und die Zellen erneut mit FuGENE-HD transfiziert. Bei der zweiten Transfektion wurden dann zwei Plasmide in die Zelle gebracht, welche für die beiden Glykoproteine NiV-F und NiV-G kodieren. Die Mock-Kontrolle wurde genauso mit FuGENE-HD behandelt, hier wurde allerdings bei keiner Transfektion ein Plasmid zugesetzt. 22 h p.t. (erste Transfektion) bzw. 17 h p.t. (zweite Transfektion) wurde die Synzytienformation im Durchlichtmikroskop angeschaut und eine GIEMSA-Färbung durchgeführt, um die Synzytien besser detektieren zu können.

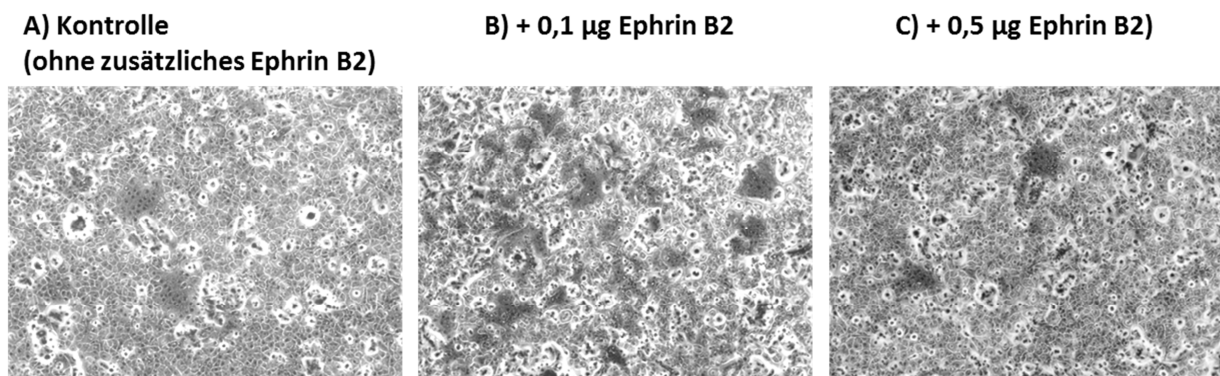


Abb. II.18: Auswirkung einer zusätzlichen Expression von humanem Ephrin B2 auf die Synzytienformation in NiV-F und NiV-G transfizierten PBEpC. Die auf *6wells* gewachsenen PBEpC wurden entweder Mock-transfiziert (Kontrolle, (A)) oder mit verschiedenen Mengen an pCAGGS-Ephrin B2 transfiziert (0,1 µg (B) oder 0,5 µg (C)). 4h p.t. erfolgte ein Mediumwechsel und eine erneute Transfektion aller Proben mit FuGENE-HD und NiV-F und NiV-G-Plasmiden. 21 h p.t. wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und es folgte eine GIEMSA-Färbung.

In Abb. II.18 ist deutlich zu erkennen, dass in den Ephrin B2-vortransfizierten Zellen mehr Synzytien zu sehen sind. Die Größe der Synzytien wurde dagegen nicht auffällig beeinflusst. Diese Beobachtungen zeigen, dass die zusätzliche Expression von humanen Ephrin B2 zu einer Erhöhung der Zell-Zell-Fusion führt.

Um ausschließen zu können, dass unterschiedliche Transfektionseffizienzen zu einer Steigerung der Synzytienanzahl führten, wurde wie unter Punkt II.4.2 beschrieben ein „Overlay-Fusionsassay“ durchgeführt. Auch hier wurden die PBEPc zunächst mit verschiedenen Mengen an Ephrin B2 transfiziert. 4 h p.t. erfolgte dann der „Overlay“ mit 1×10^5 NiV-F- und NiV-G-exprimierenden HeLa-Zellen (II.4.2). Die Kontrollproben wurden mit pCAGGS-eGFP transfiziert.

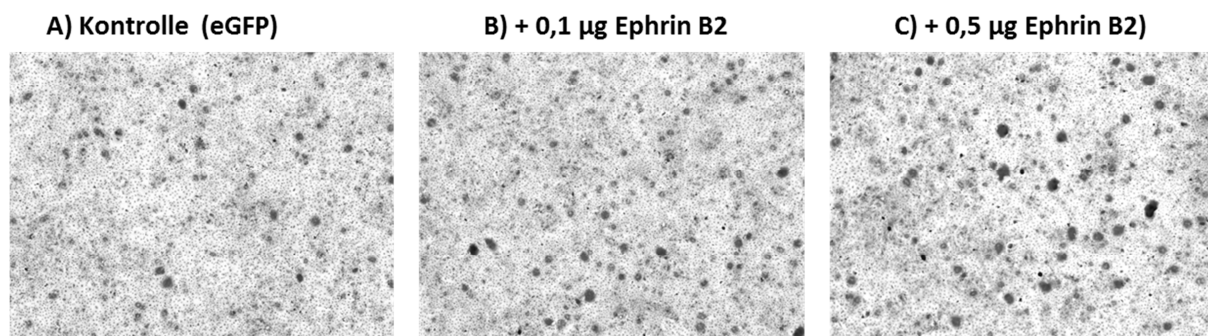


Abb. II.19: „Overlay-Fusionsassay“ nach Vortransfektion von humanem Ephrin B2. PBEPc wurden mit 0,1 µg (B) bzw. 0,5 µg (C) pCAGGS- EB2 (vgl. Abb. II.18) transfiziert. Als Kontrolle wurden PBEPc mit pCAGGS-eGFP transfiziert (A). 4 h p.t. wurden die Zellen mit NiV-F- und NiV-G-exprimierenden HeLas überschichtet wie in Abb. II.13 beschrieben. 90 min nach dem „Overlay“ erfolgte die Fixierung mit Ethanol und eine GIMSA-Färbung.

Es ist deutlich zu erkennen, dass auch im „Overlay-Fusionsassay“ die Anzahl an Synzytien in Ephrin B2-vortransfizierten Zellen erhöht ist. Wiederum wurde die Größe der Synzytien allerdings nicht beeinflusst wurden. Eine Abhängigkeit von der Ephrin B2-Menge wie in der „Doppel-Transfektion“ (Abb. II.18) ist hier zwar nicht zu sehen, allerdings konnte die Kernaussage bestätigt werden, dass durch die zusätzliche Expression von humanem Ephrin B2 die Zell-Zell-Fusion in PBEPc gesteigert werden kann. Hierbei muss allerdings festgestellt werden, dass die Transfektion mit 0,1 µg pCAGGS Ephrin B2 schon einen maximalen Effekt zu haben scheint. Größere Plasmidmengen (0,5 µg Ephrin B2) führen nicht zu mehr Fusion.

II.5.2 Auswirkungen der Ephrin B2-Überexpression auf die NiV-Infektion

Die vermehrte Synzytienbildung in PBEPc bei zusätzlicher Expression von humanem Ephrin B2 könnte entweder darauf zurückzuführen sein, dass die Menge an Ephrin B2 in den einzelnen Zellen erhöht ist, oder dass mehr Zellen Ephrin B2 an der Oberfläche exprimieren. Es sollte nun untersucht werden, ob dieser Effekt auch in der Infektion mit NiV nachweisbar ist. Hierzu sollten Ephrin B2-transfizierte PBEPc mit NiV infiziert werden und im Anschluss die Replikation durch die Bestimmung viraler RNA im Überstand (RT-PCR) und in den Zelllysaten (qPCR) nachgewiesen werden.

Dafür wurden die PBEPc auf Kollagen-beschichtete Costar-6wells ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % mit 0,1 µg pCAGGS-Ephrin B2 (+ 0,4 µg eGFP) bzw. als Kontrolle mit 0,5 µg pCAGGS-eGFP mittels FuGENE-HD transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit NiV (MOI 0,5) infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 45 min bei 37 °C wurden die Zellen fünfmal mit PBS⁺⁺ gewaschen, um nicht gebundenes Virus zu entfernen. Um virale RNA im Überstand nachweisen zu können (Abb. II.20), wurden 100 µl des Überstandes abgenommen und 350 µl RLT-Puffer + 1% β-ME zugegeben. Im Anschluss wurde zu den Proben 250 µl Ethanol gegeben und alles in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Für die Bestimmung der NiV-N und Ephrin B2-mRNA-Mengen im Zelllysate wurden die Zellen mit 350 µl RLT-Puffer und 3,5 µl β-ME für 5 min inkubiert, mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 350 µl Ethanol (100 %) wurden die Zellen in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Proben vom Überstand und aus dem Zelllysate konnten dann aus dem BSL4-Labor ausgeschleust und mittels RNeasy®-Kit isoliert werden. Im Anschluss erfolgte für den Nachweis viraler RNA im Überstand eine RT-PCR mit NiV-N-spezifischen Primern (NP5 diag und NP3 diag). Diese Proben wurden dann in einem Ethidiumbromid-haltigem, 2 %-igem Agarosegel aufgetrennt. Die NiV-N-spezifische Bande sollte eine Größe von 140 bp haben. Für den Nachweis viraler NiV N-RNA und Ephrin B2-mRNA aus infizierten Zelllysaten wurde die gesamte RNA mittels *random hexamer*-Primern und Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurden 100 ng der cDNA pro qPCR-Reaktion eingesetzt. Als interne Kontrolle wurde α-Tubulin verwendet. Diese wird zur Normierung verwendet, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen.

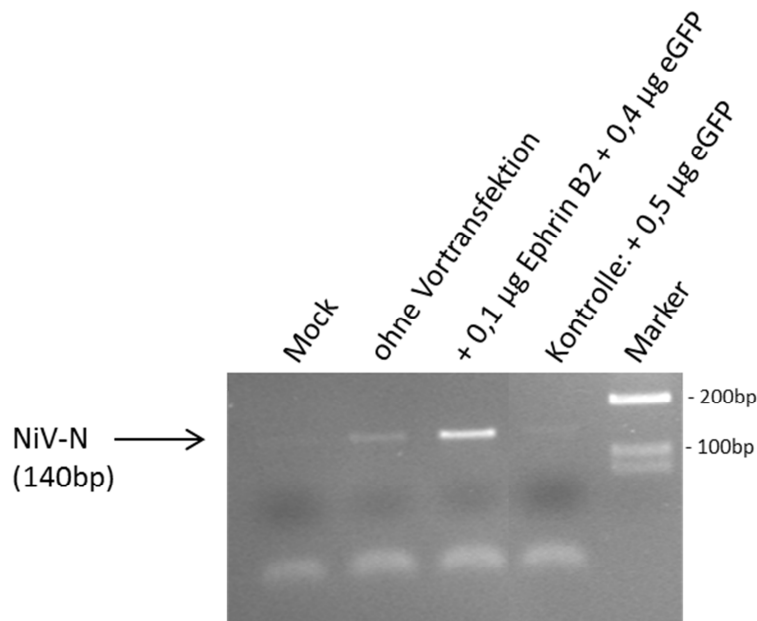


Abb. II.20: Nachweis viraler RNA im Zellkulturüberstand in Ephrin B2-transfizierten und anschließend infizierten PBEpC (48 h p.i.). PBEpC wurden auf Kollagen-beschichteten *6well*-Platten ausgesät bis sie eine Konfluenz von 80% erreicht hatten. Anschließend erfolgte eine Transfektion mit FuGENE-HD und einem pCAGGS-Plasmid, welches für Ephrin B2 kodiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit pCAGGS-eGFP transfiziert. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,5 mit NiV infiziert. 48 h p.i. wurde der Überstand abgenommen und die RNA isoliert. Anschließend wurde diese in cDNA umgeschrieben und dann mit N-spezifischen Primern amplifiziert. Anschließend wurden die Amplifikate in einem 2 %igem Agarosegel aufgetrennt.

Abb. II.20 zeigt, dass in der Kontrollinfektion NiV-N-mRNA im Überstand von infizierten PBEpC schwach nachweisbar ist (ohne Vortransfektion). Die Transfektion mit 0,1 µg Ephrin B2 vier Stunden vor der NiV-Infektion führt allerdings dazu, dass die NiV-N-mRNA deutlich ansteigt (+ 0,1 µg Ephrin B2). In der eGFP-Kontrolle ist eine schwache NiV-N Bande zu sehen (ähnlich wie in der Kontrollinfektion), was darauf schließen lässt, dass die Transfektionsprozedur an sich die NiV-Infektion nicht verbessert.

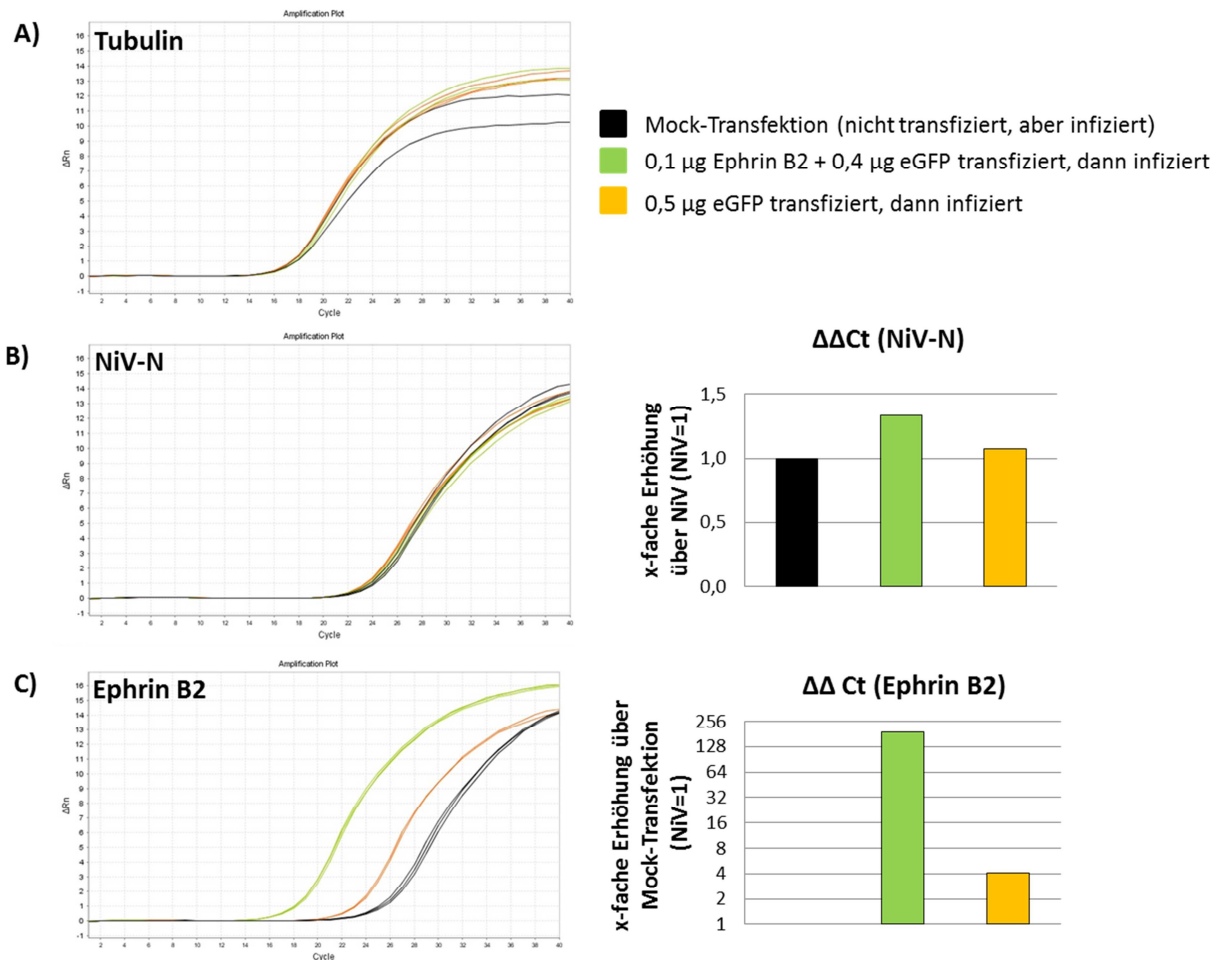


Abb. II.21: Auswirkung der zusätzlichen Expression von humanem Ephrin B2 auf die NiV-Infektion in PBEpC. PBEpC wurden auf Kollagen-beschichteten 6well-Platten ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen entweder Mock-transfiziert (Probe Mock und ohne Vorbehandlung) oder mit verschiedenen Mengen an Ephrin B2 (0,1 µg und 0,5 µg) bzw. mit der äquivalenten Menge an eGFP (Kontrolle) transfiziert und alle Proben anschließend mit NiV (MOI von 0,5) infiziert. Die RNA wurde 48 h p.i. aus den Zelllysaten mittels RNEasy®-Kit isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte die qPCR mit spezifischen Primern gegen NiV-N, Ephrin B2 und als interne Kontrolle Tubulin. In A) sind die Amplifikationsplots für die drei untersuchten mRNA's gezeigt. Die Quantifizierung der NiV-N-mRNA (B) und Ephrin B2 (C) erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Berechnung (siehe V.1.8).

Die Ergebnisse für den NiV-N und Ephrin B2-Nachweis in Lysaten NiV-infizierter porciner Bronchial-Epithelzellen ist in Abb. II.21 gezeigt. Hier sind die Amplifikationsplots für NiV-N, Tubulin und Ephrin B2-mRNA 48 h p.i. dargestellt. Die Tubulinmengen scheinen in transfizierten Zellen leicht erhöht zu sein (Abb. II.21.A). Dabei ist zu erkennen, dass NiV-N-mRNA in ähnlichen Mengen in allen Ansätzen vorhanden ist. Schaut man sich die $\Delta\Delta C_t$ -Werte (Abb. II.21.B) an, bei denen die N-mRNA-Menge auf die jeweilige Tubulinmenge normalisiert ist und die den Anstieg der RNA-Menge über die Mock-Transfektion angeben, so sieht man eindeutig, dass die Überexpression von Ephrin B2 (grüne Kurven und Balken) zu

keiner Erhöhung der NiV-N-mRNA in Zelllysaten führt. Auch die Vortransfektion von eGFP scheint keinen Einfluss auf die Infektion zu haben.

Dass die Transfektion des pCAGGS-Ephrin B2-Plasmids funktioniert hat ist in Abb. II.21.C zu sehen. Wurden 0,1 µg pCAGGS-Ephrin B2 vortransfiziert, sind die Ephrin B2-mRNA-Mengen deutlich erhöht (grüne Kurven, C_t -Werte:16). Dies entspricht einer 200fachen Erhöhung über der Mock-Transfektion (siehe Abb. II.21.C: $\Delta\Delta C_t$ Ephrin B2). Allerdings ist hier ein Effekt der Vortransfektion mit eGFP zu erkennen. So ist deutlich zu sehen, dass Ephrin B2 durch die Transfektion mit eGFP hochreguliert wird (orange Kurve, C_t -Wert: 20, dies entspricht einer 4 fachen Erhöhung über Mock-Transfektion, Abb.II.21.C).

II.6 Unterschiede in der Ephrin-Expression bei verschiedenen Individuen

II.6.1 Vergleich der Rezeptorexpression in verschiedenen humanen Spendern

Die hier gezeigten Daten veranschaulichen deutlich den Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression und Infizierbarkeit. Die Menge an Rezeptoren auf der Oberfläche primärer Zielzellen scheint dafür verantwortlich zu sein, wie gut diese mit NiV infiziert werden können und wie schnell sich die Infektion mittels Zell-Zell-Fusion ausbreiten kann. In den bisherigen Untersuchungen waren dabei humane Bronchial-Epithelzellen immer besser und schneller infizierbar als PBEPc und zeigten eine deutlich höhere Ephrin-Expression. Die Frage, die sich dabei stellt, ist: Wie konstant ist die Expression von Ephrin innerhalb einer Spezies?

Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene Spender und verschiedene Abschnitte der humanen Lunge auf die Ephrin B2 Menge getestet. Für die vorherigen gezeigten Versuche wurden humane Bronchial-Epithelzellen aus verschiedenen Passagen von zwei unterschiedlichen Spendern verwendet. Um die Ephrin-Menge verschiedener humaner Spender zu vergleichen, wurde aus den beiden bisher verwendeten HBEPc-Spendern (Donor 1+2) sowie einem weiteren Spender (Donor 3), dessen Zellen noch nicht für Infektionsversuche verwendet wurden, die RNA isoliert und mit *random hexamer*-Primern in cDNA umgeschrieben. Für die qPCR (V.1.7) wurden spezifische humane Ephrin B2-Primer verwendet. Als interne Kontrolle diente Tubulin.

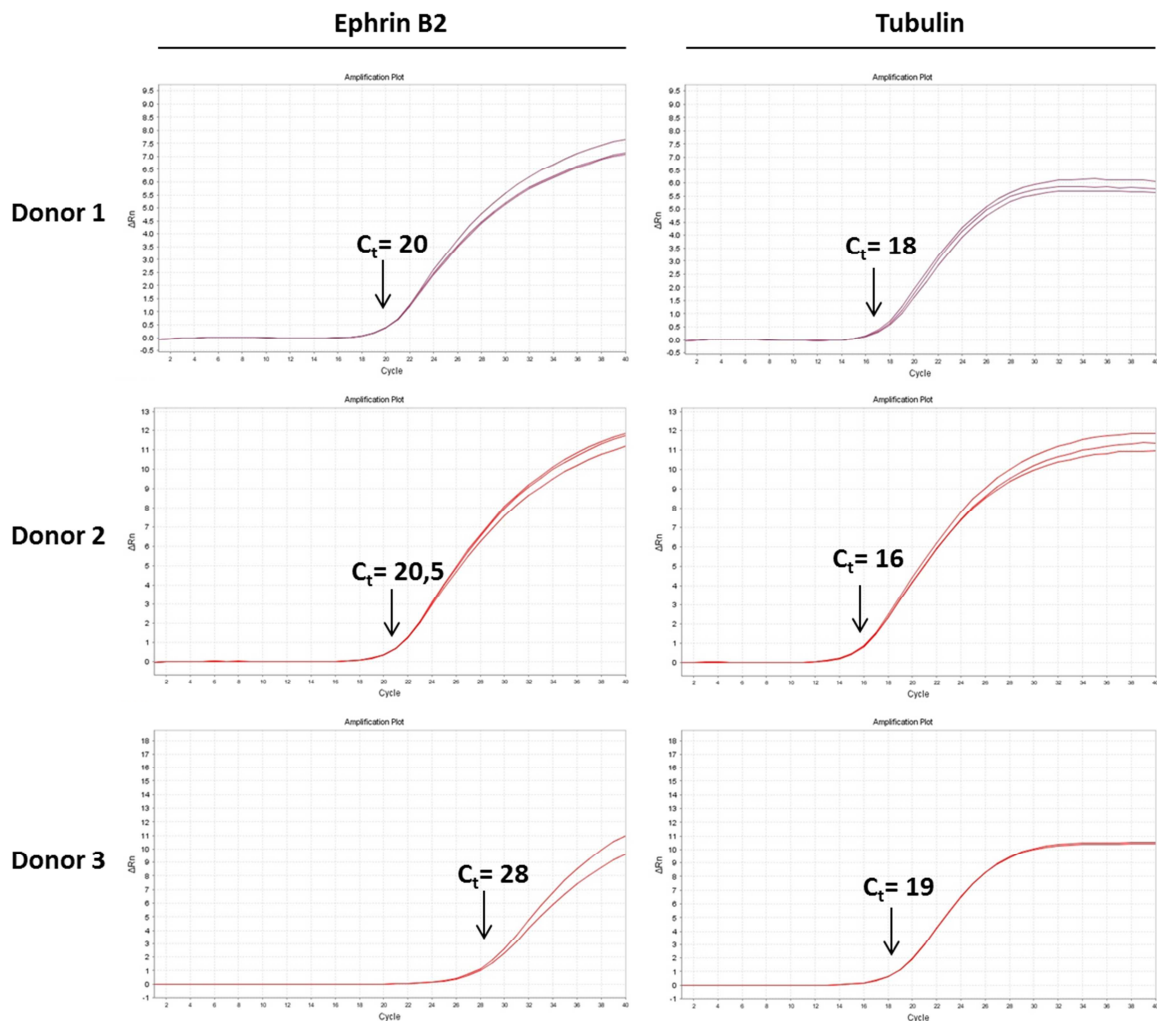


Abb. II.22: Vergleich der Ephrin B2-mRNA in HBEpC aus verschiedenen humanen Spendern (ProViro). HBEpC wurden auf Kollagen-beschichtete *6well*-Platten ausgesät und kultiviert bis sie eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht hatten. Die RNA wurde mit Hilfe eines RNeasy®-Kit isoliert und mit *random hexamer*-Primern in cDNA umgeschrieben. Für die qPCR-Reaktionen (jeweils 100 ng der cDNA) wurden Ephrin B2 bzw. Tubulin-spezifische Primer verwendet.

Es zeigte sich, dass die HBEpC der zwei ersten Spender (Donor 1, Donor 2) relativ ähnliche Ephrin B2-mRNA-Mengen exprimierten. Bei beiden wurde ein C_t-Wert von ca. 20 ermittelt. Im Vergleich zu den porcinen Bronchial-Epithelzellen ist das eine vielfach höhere Menge an Ephrin B2 (siehe Abb. II.16 und Abb. II.21, C_t-Wert für PBEpC: ca. 26). Interessanterweise zeigte sich bei den HBEpC des dritten Spenders (Abb. II.22, Donor 3) ein unterschiedliches Bild. Hier konnten nur sehr geringe Mengen an EB2-mRNA detektiert werden. Somit wiesen diese humanen Zellen hinsichtlich der Rezeptormenge eine große Ähnlichkeit zu den porcinen Bronchial-Epithelzellen auf.

Um eine größere Vielfalt an humanen Bronchial-Epithelzellen untersuchen zu können, wurde uns von der AG Schmeck (iLUNG, Marburg) RNA von humanen bronchiale Epithelzellen zur Verfügung gestellt, welche aus Patientenmaterial von Operationen am Marburger Uniklinikum gewonnen wurden.

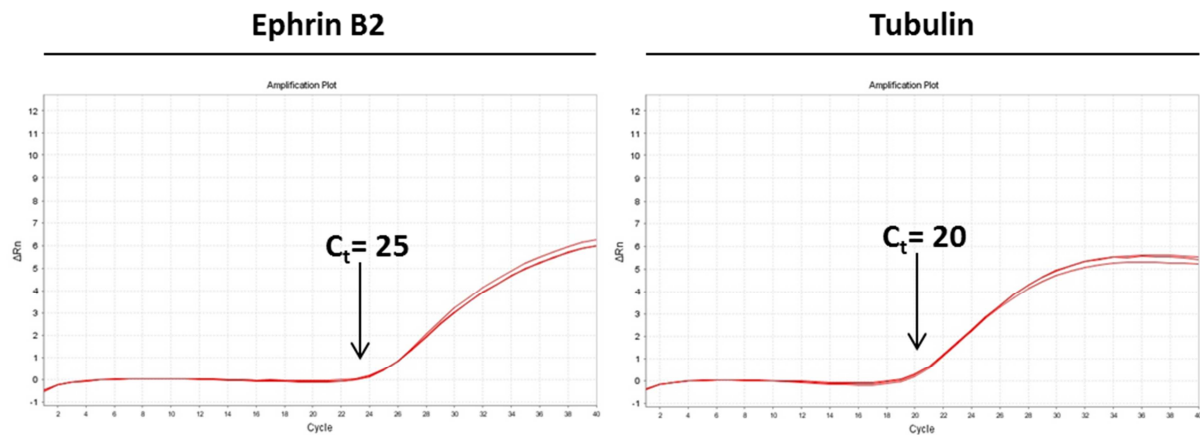


Abb. II.23: Vergleich der Ephrin B2-mRNA in humanen Zellen aus Patientenmaterial (zur Verfügung gestellt von AG Schmeck, iLung, Marburg). Die erhaltene RNA wurde mit *random hexamer*-Primern in cDNA umgeschrieben. Für die qPCR-Reaktionen (jeweils 100 ng der cDNA) wurden Ephrin B2 bzw. Tubulin -spezifische Primer verwendet.

In Abb. II.23 ist zu erkennen, dass die humanen Bronchial-Epithelzellen einen C_t -Wert von 25 zeigten. Somit liegt der C_t -Wert zwischen den Werten für die Zellen der Fa. ProViro (Donor 1+2 C_t -Wert: 20; Donor 3: C_t -Wert: 28) und bestätigt die Variabilität der Ephrin B2-Expressionsmenge in humanen Bronchial-Epithelzellen.

II. 6.2 Einfluss geringer Ephrin-Mengen auf die Infizierbarkeit von humanen Zellen

Da die HBEpC von Donor 3 (Fa. ProViro) hinsichtlich der Rezeptormenge eine große Ähnlichkeit zu den porcinen Bronchialzellen aufwiesen, sollte analysiert werden, ob diese Zellen ähnlich infizierbar sind.

Um zu bestätigen, dass die Rezeptormenge für die unterschiedliche Infizierbarkeit der verschiedenen Zellen verantwortlich ist, wurden HBEpC von Donor 3 (Fa. ProViro) mit NiV (MOI von 0,5) infiziert. Dafür wurde ein Teil der Zellen mittels Passagekit 4 abgelöst und die genaue Zellmenge bestimmt. Im Sicherheitslabor wurden die Zellen wie unter Punkt V.4.3

beschrieben mit NiV infiziert und 48 h p.i. 100 µl des Überstands abgenommen. Um den Überstand zu inaktivieren wurden 250 µl RLT-Puffer (+ 1% β -ME) zugegeben. Nach Ausschleusen der Proben wurde die RNA nach Hersteller-Angaben mit dem RNeasy®-Kit isoliert und mittels RT-PCR in DNA umgeschrieben. In der RT-PCR wurde mit spezifischen Primern für das NiV-N die virale RNA im Überstand der infizierten Zellen nachgewiesen (Abb. II.24 A). Zusätzlich wurde 48 h p.i. die virale RNA aus infizierten HBEpC-Zelllysaten wie unter Punkt II.2.1 beschrieben isoliert und anschließend eine qPCR mit NiV-N-spezifischen Primern durchgeführt (Abb. II.24.B).

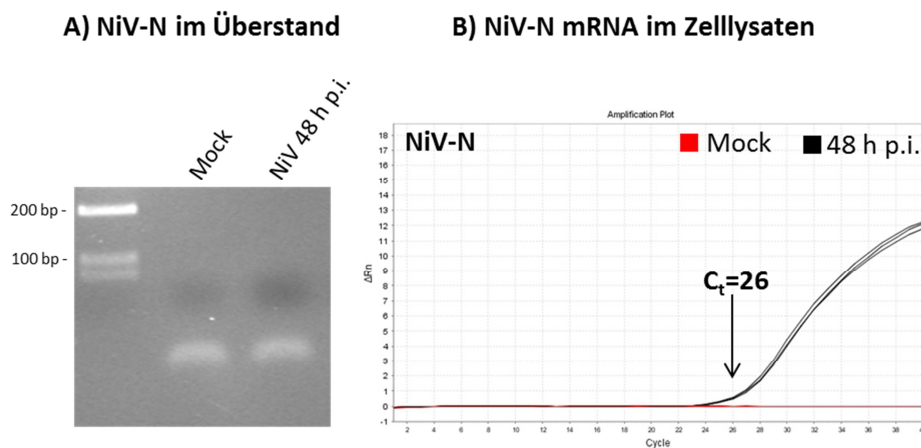


Abb. II.24: NiV-Infektion von HBEpC (Donor 3). HBEpC (Donor 3) wurden unter BSL4-Bedingungen mit NiV mit einer MOI von 0,5 infiziert. 48 h p.i. wurden 100 µl des Überstands von infizierten Zellen abgenommen und mit 250 µl RLT-Puffer + 1 % β -ME versetzt und aus dem Sicherheitslabor ausgeschleußt. Anschließend erfolgte eine RT-PCR mit NiV-N-spezifischen Primern. Die PCR-Produkte wurden dann in einem 2 %-igem Agarosegel aufgetrennt (A). Zum Nachweis viraler RNA im Zelllysat wurden die infizierten Zellen mit 350 µl RLT-Puffer + 1 % β -ME lysiert, mit 350 µl Ethanol (100 %) versetzt und aus dem BSL4-Labor ausgeschleußt. Anschließend wurde die RNA mittels RNeasy®-Kit isoliert, eine cDNA-Synthese mit *random hexamer*-Primern sowie eine qPCR mit NiV-N-spezifischen Primern durchgeführt (B).

Die RT-PCR zeigte, dass kein NiV-N im Überstand von infizierten humanen Zellen nachweisbar war. Das bedeutet, dass die HBEpC des Donors 3 48 h p.i. nur wenig oder kein Virus freigesetzt hatten. Im Zelllysat war jedoch NiV-N-mRNA zu detektieren. Vergleicht man diese Infektion mit den unter II.2.1 dargestellten HBEpC und PBEpC-Infektionen (24 h p.i.), so

ähneln die NiV-N-mRNA-Level in den HBEPc des Donors 3 den Werten der PBEpC. Diese Beobachtungen bestätigen einerseits, dass eine reduzierte Rezeptorexpression eine reduzierte Infizierbarkeit zur Folge hat und lässt vermuten, dass individuelle Unterschiede in der Ephrin B2-Expression eine wichtige Rolle bei der Etablierung und/oder Ausbreitung einer NiV-Infektion in der menschlichen Lunge haben könnten. Außerdem zeigen die Infektionsversuche mit den verschiedenen HBEPc-Kulturen verschiedener Individuen, dass die Infektion humaner Bronchial-Epithelzellen nicht in jedem Fall besser als die Infektion von porcinen Bronchial-Epithelzellen ist. Die Daten lassen eher vermuten, dass unabhängig von der Spezies, individuelle Ephrin-Level in den Bronchial-Epithelzellen für die unterschiedliche Infizierbarkeit mit NiV verantwortlich sind.

III Diskussion

III.1 Verwendung von primären Zellen als Modellsystem zur Untersuchung einer NiV-Infektion von bronchialen Epithelzellen

In den letzten Jahren ist die Verwendung von primären Zellen für genauere Untersuchungen von verschiedenen Themengebieten wie z.B. der Analyse von Toxinen, aber auch der Wirt-Pathogen-Interaktion immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Verschiedene Vorteile, aber vor allem die Möglichkeit, der *in vivo*-Situation so nahe wie möglich zu kommen, machen den Umgang mit primären Zellen zu einem wichtigen Werkzeug. Man geht z.B. davon aus, dass sich durch die Differenzierung die Expression des Rezeptors auf den Bronchial-Epithelzellen verändert. Dies kann man auch mit primären Zellen *in vitro* erreichen und hat damit weitreichende *ex vivo* Untersuchungsmöglichkeiten. Ein Beispiel für wichtige Schlussfolgerungen durch Studien in primären differenzierten Bronchial-Epithelzellen ist die Infektion mit BRSV (bovines respiratorisches Synzytial Virus). Es ist beschrieben, dass BRSV das respiratorische Epithel von Rindern infizieren kann (Valarcher et al., 2007). Infektionen von ausdifferenzierten bovinen Bronchial-Epithelzellen zeigten jedoch, dass Epithelzellen nur sehr schwer von apikal infizierbar sind. Daraus konnte man ableiten, dass *in vivo* die initiale Infektion wahrscheinlich über intraepitheliale dendritische Zellen eingeleitet wird (Goris et al., 2009).

Um die Nipahvirus (NiV)-Infektion von respiratorischen Epithelzellen vom Schwein und vom Menschen vergleichen zu können, habe ich ein Zellkultursystem etabliert, welches es erlaubt, beide Zellspezies unter möglichst gleichen Bedingungen untersuchen zu können. Dabei sollten die zu vergleichenden Zellen aus denselben Abschnitten der Lunge stammen, um Einflüsse auf die Infizierbarkeit aufgrund einer unterschiedlichen Zelltyp-Zusammensetzung (Epithelzellen, Becherzellen) auszuschließen. Die Verwendung primärer Zellen für die Untersuchung von NiV-Infektionen ist auch deshalb wichtig, weil in vielen (Tumor-)Zelllinien die NiV-Rezeptoren Ephrin B2 und Ephrin B3 oft hochreguliert sind (Adams, 2002; Hafner et al., 2004), was natürlich die Infizierbarkeit einer Zellkultur massiv beeinflussen kann. Im Gegensatz zu primären humanen Bronchial-Epithelzellen, sind porcine Bronchial-Epithelzellen nicht kommerziell erhältlich. Es konnte aber eine effiziente Isolationsmethode für respiratorische Epithelzellen aus der Schweinlunge etabliert werden.

Mittels Immunfluoreszenz-Analysen und TNF α -Stimulationsexperimenten konnte dabei die Reinheit und Identität der Epithelzellen eindeutig nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse II 1.1 und II 1.2).

Ein Nachteil bei der Verwendung von primären Zellen ist die begrenzte Menge. Denn wie auch in der natürlichen Umgebung im Körper, sind die Zellen nur begrenzt in der Lage, sich zu teilen und das auch nur, wenn sie unter richtigen Bedingungen (Hormone, Wachstumsfaktoren etc.) kultiviert werden. Ein weiteres Problem ist, dass primäre, adherente Zellen nur schwer von der künstlich zur Verfügung gestellten extrazellulären Matrix (hier Kollagen) abgelöst werden können, ohne dass die Trypsinbehandlung die Oberflächenproteine proteolytisch inaktiviert, was zur Folge hat, dass die Zellen nicht mehr richtig anwachsen. Unter Verwendung des Passagekits 4 der Firma ProViro war es jedoch möglich die Zellen bis zu viermal zu Passagieren, ohne dass der Epithel-Charakter der Zellen verloren ging (siehe Ergebnisse II.1.1). Dies erleichterte maßgeblich den Vergleich verschiedener Versuche, da man Zellen desselben Ursprungs für mehrere Experimente benutzen kann. Auch ist es letztendlich gelungen, die primären Zellen zu transfizieren. Während die meisten Transfektionsreagenzien oft zu toxisch sind, war es mit FuGENE-HD möglich, gute Transfektionseffizienzen bei minimaler Toxizität zu erzielen. Dies erlaubte die Untersuchung einzelner viraler Proteine ohne viralen Kontext. Somit konnten wir alle benötigten Experimente mit den primären Zellen durchführen, ohne auf permanente Epithelzelllinien wie z.B. A549 ausweichen zu müssen.

III.2 Humane Bronchial-Epithelzellen sind effizienter mit NiV infizierbar als porcine Epithelzellen

In dieser Arbeit wurden mehrere Infektionsvergleiche durchgeführt, um zu klären, warum die Infektion im Respirationstrakt vom Schwein effizienter verläuft, als die im Menschen. Während der NiV-Ausbrüche in Malaysia kam es zur Übertragung der Viren über Aerosole oder eventuell auch durch Schmierinfektionen von infizierten Schweinen auf andere Schweine. Im Gegensatz dazu sind keine Fälle bekannt, bei denen es zu einer Mensch-zu-Mensch-Übertragung kam. Dies lässt vermuten, dass der Respirationstrakt von Schweinen stark befallen ist und Schweine NiV über Aerosole, vor allem über nasale Ausscheidungen

übertragen können (Berhane et al., 2008, Li et al., 2010, Middleton et al., 2002; Weingartl et al., 2005; Review Rockx et al., 2012). Im Menschen hingegen geht man eher von einer geringen respiratorischen Beteiligung aus. Daraus stellte sich die Frage, ob die Zellen aus dem Respirationstrakt von beiden Spezies unterschiedlich effizient infizierbar sind. Eine Adaptation der Viren beim Übergang vom Schwein auf den Menschen kann hier keine Rolle spielen, da die NiV-Isolate, welche von infizierten Schweinen und Menschen isoliert wurden, in ihrer Sequenz identisch sind (AbuBakar, 2004). Dass humane bronchiale Epithelzellen aus dem oberen und unteren Respirationstrakt (*small airway epithelial cells*) sehr effizient mit NiV infiziert werden können, wurde bereits von Escaffre et al. (2013) gezeigt. Hier wird vorgeschlagen, dass NiV über eine Infektion der Epithelien in die Endothelzellen der Lunge gelangt. Damit gelangt das Virus dann wahrscheinlich in den Blutkreislauf und erreicht so seinen Zielort, die mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns (Escaffre et al., 2013). Trotz der vermuteten NiV-Infektion des respiratorischen Epithels im Menschen, zeigen sich hier, im Gegensatz zum Schwein, keine klinischen Symptome. Dies deutet darauf hin, dass die NiV-Infektion in beiden Spezies eine unterschiedliche Reaktion in der Lunge hervorruft.

Dass es zu Unterschieden in der Wirtsantwort auf die NiV-Infektion kommen kann, wurde bereits durch mehrere Tiermodelle gezeigt (Review Escaffre et al., 2013; Rockx et al., 2012). Die molekularen Ursachen für diese Unterschiede sind allerdings noch nicht verstanden und näher untersucht. Experimentelle Infektionen von Schweinen zeigten, dass die Infektionsroute wichtig ist. Dies konnte bereits auch am Hamstermodell bestätigt werden (Rockx et al., 2011). Wurden die Schweine via oraler Infektion infiziert, kam es nicht zur Ausbildung von schweren klinischen Zeichen. Infektion über den subkutanen Weg hingegen führten zur Ausbildung von neurologischen und respiratorischen Symptomen (Middleton et al., 2002). Dies deutet schon darauf hin, dass NiV bestimmte Zellen als initialen Eintrittsort in den Körper benötigt. Und zwar geht man davon aus, dass das nasale Epithelium *in vivo* als Eintrittsort für NiV fungiert und sich die Infektion in den Bronchien manifestiert. Dieser Eintrittsort wird allerdings nur für Schweine aufgrund ihres Schnüffel-Verhaltens angenommen (Rockx et al., 2012). Bei der Infektion vom Menschen ist noch nicht bekannt, welcher Abschnitt des Respirationstraktes als Eintrittsort für NiV fungiert. Man geht aber davon aus, dass die Lunge später in der Infektion bei beiden Spezies für die Ausbreitung unterschiedlich wichtig ist. Das könnte darauf hindeuten, dass die insgesamt Replikation in humanem und porcinem Epithelgewebe qualitativ oder quantitativ unterschiedlich verläuft.

Die vergleichenden Infektionsversuche dieser Arbeit zeigen, dass sich die Zellen in der Tat quantitativ unterschiedlich effizient infizieren lassen. In sub-konfluenten aber auch konfluenten Zellen war NiV-N bereits 24 h p.i. deutlich in Zelllysaten von humanen Bronchial-Epithelzellen nachweisbar. Auch eine Synzytienformation war erkennbar (siehe Ergebnisse Abb. II.5.A. und B.). In porcinen Zellen hingegen konnte erst 48 h p.i. eine NiV-Infektion nachgewiesen werden. Zum selben Zeitpunkt war die Ausbreitung der Infektion in humanen Zellen schon deutlich ausgeprägter. Hier waren nahezu alle Zellen NiV-positiv (siehe Ergebnisse Abb. II.5.C). Weiterhin wurde von den humanen Bronchial-Epithelzellen mehr NiV freigesetzt als von porcinen Bronchial-Epithelzellen (siehe Ergebnisse Abb. II. 5.D). Diese Beobachtungen bilden einen deutlichen Kontrast zu den *in vivo*-Beobachtungen, die eher auf eine deutlich ineffizientere Virusvermehrung im menschlichen Respirationstrakt hinweisen (keine Lungensymptome, keine Virusübertragung über respiratorische Sekrete). In den hier durchgeführten *in vitro* Infektionsstudien wurden reine Epithelzellkulturen verwendet. Hierbei waren deshalb nicht, wie natürlicherweise in der Lunge, Immunzellen oder Makrophagen/dendritische Zellen vorhanden, die eine Infektion möglicherweise unterdrücken könnten. Dies könnte eine Erklärung für die sehr effiziente *in vitro* Infektion sein. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass das NiV nicht über die bronchialen Zellen, sondern schon im Nasen-Rachen-Raum in den Körper gelangt. Auch wurden für die hier vorgestellten Experimente keine ausdifferenzierten Zellen genutzt. Das bedeutet, dass hier nicht alle Zelltypen vorliegen, welche in der Lunge vorhanden sind wie z.B. Mukus-bildende Zellen. Das Fehlen der anti-mikrobiellen Mukus-Schicht auf den Zellen könnte einen großen Einfluss auf den Eintritt der Viren in die Zellen haben. Diese schützende Schicht besteht aus verschiedenen Proteinen (Mucine), welche von Mukus-bildenden Zellen generiert und abgegeben werden. Dadurch erfolgt ein Schutz und die Viren müssen diese Schicht zunächst überwinden können, was die Infektion *in vivo* deutlich erschweren könnte.

Es ist beschrieben, dass es im bronchialen Epithelium des Menschen nur zu einer geringen Hochregulation von Schlüsselzytokinen wie IL-6 kommt (Escaffre et al., 2013). Allerdings ist eine starke Zytokinantwort in tieferliegenden Lungenabschnitten, also in alveolären Zellen beschrieben. Diese Ergebnisse können auch mit *in vivo*-Beobachtungen in Zusammenhang gebracht werden, denn auch hier konnte keine Inflammation der Bronchien vom Mensch nach NiV-Infektion beobachtet werden (Wong et al., 2002). Dass allerdings die Zytokinantwort auf eine NiV-Infektion nicht immer gleich verläuft, wurde in Hamster-

Experimenten gezeigt. Hier konnte auch in den Bronchien eine deutliche Hochregulation von verschiedenen Zytokinen nach NiV-Infektion gemessen werden (DeBuysscher et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass Wirtsfaktoren der Zielzellen bedeutend für eine effiziente NiV-Infektion sind.

III.3 Ubiquitäre Wirtsfaktoren sind nötig für den breiten Speziestropismus von NiV

Wichtige Voraussetzungen für eine effiziente speziess-übergreifende Infektion sind Wirtsfaktoren, die ubiquitär in allen Spezies vorhanden sind. Für seine effiziente Ausbreitung bedient sich NiV an mehreren Stellen seines Replikationszykluses verschiedener solcher ubiquitärer Wirtsproteine. Wichtigste Voraussetzung für den Viruseintritt und eine durch Zell-Zell-Fusion vermittelte Ausbreitung des Virus, ist neben der G-Bindung an zelluläres Ephrin, die Fusionsaktivität des F-Proteins. Hierbei ist die Prozessierung des inaktiven Vorläuferproteins F₀ abhängig von der Expression einer endosomalen Wirtsprotease. Sowohl bei den NiV-Rezeptoren, als auch bei den NiV-Aktivierungsproteasen handelt es sich um Proteine, welche in nahezu allen Säugerspezies vorhanden sind. Dies ermöglicht es dem Virus, viele verschiedene Säugerspezies wie Mensch, Hund, Katze, Meerschweinchen, Hamster und Schwein zu infizieren (Anonymous 1999 a, b; Chua et al., 2000; Wong et al., 2003; Weingartl et al., 2005; Mungall et al., 2007; Review Weingartl et al., 2009). Dieses breite Wirtsspektrum wird nicht zuletzt dadurch erreicht, dass NiV nicht nur einen Rezeptor und eine einzige Aktivierungsprotease verwenden kann. Dies wurde unter anderem dadurch gezeigt, dass NiV-infizierte Regionen im Hirn identifiziert werden konnten, in denen der Hauptrezeptor Ephrin B2 überhaupt nicht exprimiert wird. Grund für die Infektion war, dass NiV neben Ephrin B2 auch Ephrin B3, welches in diesen Hirnregionen abundant exprimiert wird, als Rezeptor für einen erfolgreichen Eintritt in die Zelle nutzen konnte (Negrete et al., 2006). Als Spaltungsprotease für das NiV Fusionprotein wurde ursprünglich Cathepsin L beschrieben. Diese Wirtsprotease wird z.B. in Vero-Zellen benötigt um die Aktivierung des Fusionsproteins zu gewährleisten (Pager et al., 2006). Später zeigte sich, dass in einigen Zellen, z.B. MDCK-Zellen, wenig aktives Cathepsin L vorhanden ist. Trotzdem replizieren die Viren in diesen Zellen sehr effizient. Durch verschiedene Inhibitorstudien konnte hier als Ursache die starke Expression von Cathepsin B identifiziert werden, ein weitere endosomalen Protease mit offensichtlich redundanter Funktion (Diederich et al., 2012). Zu

Beginn dieser Arbeit war noch völlig unklar, welche Rezeptoren und Aktivierungsproteasen in Bronchial-Epithelzellen eine Rolle spielen und ob es Unterschiede in der Abhängigkeit der NiV-Replikation von diesen essentiellen Wirtsfaktoren in den primären Zielzellen vom Mensch und Schwein gibt.

III.4 Cathepsine sind wichtige Wirtszellfaktoren für NiV und andere pathogene Viren

Cathepsin L und B gehören zu der Familie der Cysteinproteasen, sie sind hoch konserviert und werden in vielen Säugerzellen exprimiert. Dies ist von entscheidendem Vorteil für viele Viren. Dabei beschränkt sich die Nutzung der Cathepsine nicht nur auf das Genus der Henipaviren. Denn nicht nur bei der Aktivierung der Fusionsproteine von Hendra- und Nipahviren spielen die beiden Cathepsine eine Rolle. Es konnte auch gezeigt werden, dass für einen funktionellen Viruseintritt das Glykoprotein GP des Ebolavirus durch Cathepsin B im Endosom gespalten werden muss (Chandran et al., 2005; Kaletsky et al., 2007; Schornberg et al., 2006). Weiterhin sind beide Cathepsine für den Eintritt von Reoviren und SARS-Corona-Viren nötig (Ebert et al., 2002; Simmons et al., 2005). Cathepsin B ist auch noch an weiteren wichtigen Schritten während der Replikationszyklen verschiedener Viren beteiligt. In Dengue-Virus (DENV) infizierten HepG2 Zellen kommt es zur Erhöhung der Cathepsin B-Expression in den Lysosomen und zur Permeabilisierung der lysosomalen Membran. Dadurch gelangt Cathepsin B in das Zytoplasma und aktiviert Caspase 9 und Caspase 3, was zur Aktivierung des intrinsischen *pathways* der Apoptose und zum Absterben der Virus-infizierten Zelle führt (Morchang et al., 2013). Dass Cathepsin B in den programmierten Zelltod involviert ist, wurde auch bei der Infektion von Monozyten mit Herpes-simplex-Viren gezeigt (Peri et al., 2011). Es sind also viele unterschiedliche Mechanismen bekannt, bei denen Cathepsine eine wichtige Rolle spielen. Die Frage stellt sich nun, warum noch keine Therapiemöglichkeiten gefunden wurden, um Cathepsine zu beeinflussen, um somit eventuell die Replikation und Ausbreitung verschiedener Viren zu verhindern. Untersuchungen an Cathepsin B (CTS B) und Cathepsin L (CTS L) *knockout*-Mäusen zeigten, dass sowohl *cts B*^{-/-} als auch *cts L*^{-/-} *knockout*-Mäuse lebensfähig sind. Das bedeutet, man müsste diese Cathepsine inhibieren können ohne allzu große Schäden zu verursachen. Allerdings hatte die Untersuchung der Cathepsin *knockout*-Mäuse gezeigt, dass diese nur lebensfähig sind, weil jeweils das andere, nicht ausgeschaltete Cathepsin die

Aufgaben übernehmen konnte. Mäuse, denen Cathepsin L und Cathepsin B gleichzeitig fehlen waren nicht überlebensfähig (Sevenich et al., 2006; Felbor et al., 2002). Da für eine effiziente Hemmung der NiV-Replikation beide Cathepsine gehemmt werden müssten, ist es schwierig, eine geeignete, nicht zu toxische Therapie zu entwickeln. Dennoch konnte schon ein wichtiger Schritt für eine anti-virale Therapie gegen verschiedene Viren, welche Cathepsine für eine effiziente Ausbreitung benötigen (SARS-CoV, HeV, NiV) von Elshabrawy und Kollegen gemacht werden. Sie untersuchten verschiedene synthetische Peptide, welche die Cathepsin L-vermittelte Spaltung blocken können, ohne zu toxisch für die Zellen zu sein (Elshabrawy et al., 2014). Das Peptid 5705213 und sein Derivat 7402683 stellen gute Kandidaten dar, um die Infektion von SARS-CoV, Ebola und der Henipaviren zu inhibieren.

III.5 Cathepsin B ist die Aktivierungsprotease für NiV-F im Respirationstrakt vom Schwein und Mensch

Es ist bekannt, dass abhängig vom Zelltyp und Spezies unterschiedliche Cathepsine für die Spaltung des Fusionsproteins (NiV-F) verantwortlich sind (Pager et al., 2006; Diederich et al., 2012). Um nun zu überprüfen, welche Protease für die proteolytische Aktivierung des NiV-F im respiratorischen Epithel von Schweinen und Menschen verantwortlich ist und ob es sich hierbei um unterschiedliche Proteasen handelt, wurden Aktivitätsprofile der beiden Proteasen erstellt und Inhibitorstudien durchgeführt. Die Auswertung aller Daten zeigte deutlich, dass bei beiden Säugerspezies Cathepsin B für die Prozessierung verantwortlich ist. Bei beiden war eine hohe Cathepsin B-Aktivität nachweisbar, jedoch kaum Cathepsin L (siehe Ergebnisse II.3.1.). Dies ähnelt sehr stark dem bereits veröffentlichten Cathepsin-Profil für MDCK-Zellen (Diederich et al., 2012), in denen auch Cathepsin B die verantwortliche Protease ist. Auch Inhibitorstudien haben dies bestätigt. Blockte man Cathepsin B mit dem spezifischen Inhibitor NS134P so war keine Prozessierung des Fusionsproteins in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen mehr sichtbar (siehe Ergebnisse Abb. II.10). Die noch sichtbare geringe Restspaltung in HBEpC ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass die eingesetzte Menge an Inhibitor nicht ausreichend war, um das Cathepsin vollständig zu hemmen. Das Vorhandensein gleicher Mengen von aktivem Cathepsin B bedeutet allerdings noch nicht notwendigerweise, dass das NiV-Fusionsprotein tatsächlich gleich effizient gespalten wird. Untersuchungen zur F-Prozessierung zeigten aber, dass die

Spaltungseffizienz des Fusionsproteins sowohl in HBepC als auch in PBepC Zellen zwischen 50 % und 60 % liegt (siehe Ergebnisse Abb. II.9). Unterschiede in der Cathepsin-Expression oder der Aktivierung des Fusionsproteins erscheinen somit nicht als wahrscheinlicher Grund für die schlechtere Virusvermehrung in PBepC.

Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass weitere Proteasen in die F-Aktivierung involviert sind. Untersuchungen an Cathepsin L- und Cathepsin B-defizienten MEF (Fibroblasten aus Embryonen von Cathepsin-*knockout*-Mäusen; *ctsl*^{-/-}/*ctsb*^{-/-}) zeigten hierfür erste Anhaltspunkte. In diesen Zellen konnten trotz fehlendem Cathepsin B und Cathepsin L einige infektiöse Viren nachgewiesen werden (Diederich, 2007). Dies lässt darauf schließen, dass es noch weitere Aktivierungsproteasen gibt. Beispielsweise könnten Cathepsin H, aber auch Cathepsin K aufgrund ihrer ubiquitären Verteilung mögliche Kandidaten sein. Letzteres ist vor allen wegen seiner Expression im respiratorischen Epithel (Bühling et al., 1999 und 2004; Bernstein et al., 2007; Brix et al., 2007; Godat et al., 2008) interessant. Hier könnte man durch Verwendung spezifischer Inhibitoren überprüfen, ob die Inhibierung von Cathepsin K einen Einfluss auf die Prozessierung des Fusionsproteins und die Vermehrung von NiV hat.

III.6 Die Virusrezeptormenge auf bronchialen Epithelzellen von Mensch und Schwein unterscheiden sich

Wie bereits erwähnt können Nipahviren die konservierten Proteine Ephrin B2 und Ephrin B3 als Rezeptoren nutzen (Bonaparte et al., 2005; Negrete et al., 2005; Negrete et al., 2006). Die Frage zu Beginn dieser Arbeit war, inwieweit porcine und humane Bronchial-Epithelzellen die beiden Rezeptoren exprimieren. Es zeigte sich, dass beide Ephrin B2 besitzen, aber nur die humanen Bronchial-Epithelzellen nachweisliche Mengen an Ephrin B3 aufweisen (siehe Ergebnisse Abb. II.11 und Abb. II.12). Auch humane und porcine tracheale Epithelzellen exprimierten Ephrin B2, aber nur in humanen Tracheal-Epithelzellen konnte auch zusätzlich nachweisbare Ephrin B3-mRNA detektiert werden (siehe Abb. A.1 im Anhang). Dies lässt vermuten, dass nur im Menschen signifikante Mengen an Ephrin B3 im respiratorischen Epithel exprimiert werden.

Darüber hinaus zeigten die quantitativen Vergleiche der RNA-Mengen, dass in humanen Epithelzellen mehr Ephrin B2-mRNA exprimiert wird (siehe Ergebnisse Abb. II.12). Viel mRNA

ist allerdings noch kein Garant dafür, dass auch mehr funktionelles Ephrin B2 auf der Oberfläche zu finden ist (Yoneda et al., 2006). Beispielsweise können durch Intramembran-Proteasen die Expression von Ephrinen beeinflusst werden. Für die Intramembran-Protease RHBDL2 konnte bereits beschrieben werden, dass sie Ephrin B3 so effizient spaltet, dass Ephrin B3 nicht mehr auf der Oberfläche exprimiert wird (Pascall und Brown, 2004). Weiterhin ist z.B. für Ephrin B2 beschrieben, dass seine extrazelluläre Domäne nach der Bindung an seinen EpHB4-Rezeptor durch Metalloproteinasen abgespaltet wird. Um zu bestimmen, wieviel funktionelles Ephrin auf der Oberfläche von humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen vorhanden ist, wurde deshalb hier ein „Overlay-Assay“ als funktioneller Nachweis durchgeführt (siehe Ergebnisse Abb. II.13). Auf der Oberfläche von HBEpC und PBEpC war genügend Ephrin vorhanden, um 15 h nach dem Overlay eine deutliche Synzytienbildung vermitteln zu können. Betrachtet man sich den Beginn der Synzytienformation, so startet die Fusion der HBEpC deutlich früher und resultiert in größeren Synzytien als in PBEpC (siehe Ergebnisse Abb. II.15). Da die Zellen mit denselben NiV-F und NiV-G-exprimierenden HeLa-Zellen überschichtet wurden, können Transfektionsunterschiede ausgeschlossen werden.

Insgesamt scheint auf der Oberfläche der humanen Bronchial-Epithelzellen mehr Ephrin vorhanden zu sein, was auch mit den quantitativen Unterschieden der qPCR-Ergebnisse korreliert. Um dies allerdings direkt zu zeigen, müssten zusätzlich FACS-Untersuchungen durchgeführt werden. Damit könnte die Ephrin-Menge auf der Oberfläche der Zellen quantitativ verglichen werden. Auch sollte man die Ephrin-Mengen in ausdifferenzierten Bronchial-Epithelzellen untersuchen, denn es ist im Moment noch unklar, ob auch hier eine generell stärkere Ephrinexpression in HBEpC zu finden ist. Nach der Differenzierung liegen verschiedene Zelltypen im respiratorischen Epithelium vor, wie z.B. Mukus-bildende und Zilien-tragende Zellen. Mit Hilfe spezifischer Marker-Proteine (MuC5AC als Nachweis für Mukus-bildende Zellen; Tubulin IV als Marker für Zilien-tragende Zellen) und spezifischer Ephrin-Antikörper könnte man in der FACS-Analyse das Ephrin-Profil auf der Oberfläche der unterschiedlichen Zelltypen bestimmen und somit herausfinden, ob sich die Ephrinexpression in verschiedenen Zelltypen unterscheidet. Wenn dann noch Infektionsversuche mit ausdifferenzierten Epithelzellen durchgeführt würden, könnte geklärt werden, ob NiV bestimmte Zelltypen präferentiell infiziert, das heißt, ob die Viren einen

unterschiedlichen Zelltropismus in der Lunge vom Schwein und vom Menschen zeigen und ob dieser mit unterschiedlichen Ephrinmengen in bestimmten Zelltypen korreliert.

III.7 Auswirkungen von überexprimierten humanen Ephrin B2 auf die Fusion in PBEpC

Ephrin B2 und Ephrin B3 sind Typ I Membranproteine und gehören zur Ephrinfamilie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Aufgrund der Bedeutung und ihrer Aufgaben während der Embryogenese und im erwachsenen Stadium, sind Ephrine in nahezu allen Säugerspezies, aber auch in Fischen und Amphibien zu finden (Review Pasquale 2008). Ephrine spielen zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der Angiogenese (Entstehung des vaskulären Systems; Pitulescu et al., 2010), der Morphogenese von verschiedenen Geweben, der Zellmigration (Lackmann et al., 2008) und haben eine wichtige Funktion bei Reparaturmechanismen nach Verletzungen (Pasquale 2008, Fabes et al., 2007). Die hohe Konservierung dieser Mechanismen in vielen Spezies, ist auch eine Erklärung für die hohe Homologie der Ephrine aus unterschiedlichen Säugern. Die Aminosäure-Sequenzen der beiden Ephrine aus unterschiedlichen Spezies unterscheiden sich nur wenig (Bossart et al., 2008). Ephrin B2 aus Mensch und Schwein zeigt eine Homologie von 97 % (Bossart et al., 2008). Die hohe Homologie besagt allerdings noch nicht, dass alle Ephrine gleich gut als NiV-Rezeptor genutzt werden können. Beispielsweise gibt es eine 97 % Homologie zwischen Ephrin B2 aus Mensch und aus der Maus, jedoch sind Mäuse resistent gegen eine NiV-Infektion (Wong et al., 2003), was eventuell an der Rezeptor-Expression liegen könnte. Um nun zu analysieren, ob das humane Ephrin für eine effizientere Ausbreitung des NiV besser geeignet ist wurde humanes Ephrin in porcine Bronchial-Epithelzellen transfiziert. Wie man an den C_t-Werten der qPCR sehen kann (siehe Ergebnisse Abb. II.16) wurde dadurch eine Erhöhung der Gesamtmenge an Ephrin erreicht. In den dazugehörigen Schmelzkurven sind deutlich zwei Peaks zu erkennen, d.h. zwei Amplifikationsprodukte mit verschiedenen Schmelztemperaturen (siehe Ergebnisse Abb. II.16). Dies weist auf zwei unterschiedlich große Amplifikationsprodukte oder zwei qPCR-Produkte mit unterschiedlicher Sequenz (anderer G-C-Gehalt) hin. Aus dem Vergleich mit untransfizierten humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen lässt sich ableiten, dass es sich zum einen um endogenes porcines Ephrin B2 (siehe Ergebnisse Abb. II.16, rote Kurve) und zum anderen um humanes, Plasmid-kodiertes Ephrin B2 (siehe

Ergebnisse Abb. II.16, blaue, grüne und graue Kurve) handelt. Die zusätzliche Expression des humanen Ephrin B2 in PBEpC führte zu einer Erhöhung der Zell-Zell-Fusion sowohl bei Kotransfektion der Zellen als auch im „Overlay-Fusionsassay“ (siehe Ergebnisse Abb. II.18 bzw. Abb. II.19). Interessanterweise war der positive Effekt auf das Fusionsverhalten dabei sehr deutlich, wenn nur kleine Mengen Plasmid-DNA (0,1 µg) transfiziert wurden. Bei Transfektion von 0,5 µg DNA war kaum noch ein fusionsverstärkender Effekt zu sehen (siehe Ergebnisse Abb. II.18). Ein ähnlicher Effekt war in der Arbeitsgruppe bereits früher in HeLa- und Vero-Zellen beobachtet worden (Thiel et al., 2008). Dies lässt darauf schließen, dass eine optimale Rezeptormenge an der Oberfläche der Zellen ausschlaggebend für eine effiziente Zell-Zell-Fusion ist. Um zu überprüfen, ob auch die Infektion der PBEpC durch zusätzliche Expression von humanem Ephrin B2 verbessert werden kann, wurden die Zellen 4 h nach der Transfektion mit NiV infiziert. Dabei zeigte sich, dass es 48 h p.i. zu einem Anstieg an NiV N-RNA im Überstand der infizierten Zellen kam (siehe Ergebnisse Abb. II.20). Im Gegensatz dazu war keine Erhöhung der NiV N-mRNA in den Lysaten zu detektieren (siehe Ergebnisse Abb. II.21). Dies lässt vermuten, dass 48 h nach der Infektion keine Steigerung der NiV-N-mRNA-Synthese in den Zellen mehr nachweisbar ist, sondern dass hier sowohl in den Kontrollzellen als auch in den vortransfizierten PBEpC ein „Endpunkt“ erreicht ist. Eventuell könnten hier Unterschiede zu früheren Zeitpunkten nach der Infektion gemessen werden. Die Tatsache, dass mehr N-RNA im Überstand der vortransfizierten Zellen zu finden war, spricht eindeutig für eine erhöhte Freisetzung aufgrund der zusätzlichen Ephrin-Expression. Die Kontroll-Transfektion mit eGFP führt nicht zu einer Erhöhung, was gegen einen unspezifischen Effekt durch die Transfektion spricht.

Allerdings konnte in den eGFP-vortransfizierten Zellen eine Erhöhung der Ephrin B2-mRNA in den Zelllysaten gemessen werden, was auf eine Hochregulation des endogenen porcinen Ephrin B2 durch die Transfektionsbedingungen hinweist (siehe Ergebnisse Abb. II.16). Trotz dieser erhöhten Expression des porcinen Rezeptors in GFP-transfizierten Zellen war keine vermehrte Freisetzung von N-RNA in den Überstand zu beobachten. Das könnte bedeuten, dass nur zusätzlich exprimiertes humanes Ephrin B2 die NiV-Infektion begünstigt, während erhöhte Mengen an porcinem Ephrin B2 dies nicht tun. Um hierzu aber definitive Aussagen treffen zu können, müssten Experimente durchgeführt werden, bei denen man die Expression des porcinen Ephrin B2 auf ein vergleichbares Level wie das humane Ephrin B2 bringt. Dazu müsste man PBEpC parallel mit humanem und porcinem Ephrin B2

transfizieren. Die für diese Experimente notwendigen Klonierungsarbeiten wurden bereits begonnen und nach erfolgreicher Klonierung des porcinen Ephrin B2 sollen dann Vergleichsstudien durchgeführt werden.

III.8 Hochregulation des Rezeptors Ephrin B2 durch die NiV-Infektion

Die Infektion der PBEpC und HBEpC mit NiV führt zu einer ca. 4-fachen Erhöhung der Ephrin B2-mRNA Mengen in den infizierten Zellen (siehe Ergebnisse Abb. II.13). Da für diese Untersuchung RNA der gesamten Zellkultur verwendet wurde, kann man leider keinen Rückschluss ziehen, ob die Ephrin B2-mRNA in den infizierten Zellen und/oder auf Nachbarzellen hochreguliert wurde. Käme es zu einer vermehrten Ephrin B2-Expression auf den noch nicht infizierten umgebenden Nachbarzellen, so könnte dadurch die Zell-Zell-Fusion und somit die Ausbreitung des NiV verbessert werden. Welche Mechanismen bzw. Moleküle die Expression von Ephrin B2 auf Epithelzellen beeinflussen können, ist derzeit noch völlig unbekannt. Aus Untersuchungen in Endothelzellen weiß man aber zum Beispiel, dass EphrinA1 durch TNF α hochreguliert werden kann (Holzman et al., 1990). Stimulationsversuche sowohl mit TNF α , als auch mit Interferon γ für verschiedene Zeitpunkte zeigten allerdings keinen Einfluss auf die Ephrin B2-mRNA-Menge in PBEpC.

Trotzdem ist natürlich nicht auszuschließen, dass die beobachtete Ephrin-B2-Hochregulation in NiV-infizierten Zellkulturen Cytokin-vermittelt ist. Insbesondere da bereits gezeigt werden konnte, dass es bei der Infektion humaner Bronchial-Epithelzellen zur Ausschüttung verschiedenster Cytokine und Chemokine kommt (z.B. IL-1 α , IL-8, CXCL10 und Eotaxin; Escaffre et al., 2013). Auch haben wir kürzlich eine Hochregulation von IL-1 α , IL-6 und IL-8 in infizierten PBEpC beobachtet (Daten nicht gezeigt). Um zu klären, ob diese löslichen Cytokine eine Rolle spielen, ist es geplant, den Überstand infizierter PBEpC auf naive (nicht – infizierte) PBEpC zu geben und dann zu untersuchen, ob hier eine Ephrin B2-Hochregulation erfolgt. Falls ja, müsste man den Effekt einzelner rekombinanter Cytokine wie z.B. IL-1 α oder α/β -Interferon austesten. Sollte es durch die Infektions-Überstände nicht zu einer Ephrin B2-Hochregulation in naiven Zellkulturen kommen, müsste man davon ausgehen, dass die beobachtete Rezeptor-Hochregulation nur in NiV-infizierten Zellen stattfindet und diese direkt durch die Virusreplikation oder durch die Expression bestimmter viraler Proteine verursacht wird.

III.9 Variabilität der Ephrin B2-Expression in primären Bronchial-Epithelzellen vom Menschen

Es ist noch nicht bekannt, in welchem Teil des Respirationstraktes das NiV in den Körper des Menschen gelangt. Verschiedene Tierversuche deuten allerdings darauf hin, dass das Virus wohl über das Nasenepithel in den Körper gelangen könnte (Rockx et al., 2012). Die Tatsache, dass NiV durch den Verzehr von kontaminiertem Palmsaft auf den Menschen übertragen wird, lassen vermuten, dass das Virus auch über den Rachen-Raum in den Körper gelangen kann (Luby et al., 2006, Rahman et al., 2012). Untersuchungen in Hamstern belegen deutlich, dass das respiratorische Epithel wichtig für einen effizienten Eintritt des NiV ist, aber vor allem von entscheidender Bedeutung für die Virus-Transmission auf andere ist.

Die Bedeutung einer effizienten NiV-Vermehrung im Respirationstrakt für die Übertragbarkeit der Infektion wird auch durch Beobachtungen während der NiV-Ausbrüche in Malaysia (1998/1999) und Bangladesch (seit 2000) bestätigt. Während es beim ersten Ausbruch in Malaysia nur bei 30 % der Patienten zu einer respiratorischen Symptomatik kam, zeigten in den jüngeren Ausbrüchen in Bangladesh ca. 70 % aller Erkrankten schwere Grippe-ähnliche Symptome (Escaffre et al., 2013, Lo und Rota, 2008). Und diese hohe Anzahl an respiratorisch Erkrankten war letztendlich dann auch hauptverantwortlich für die relativ häufigen Mensch-zu-Mensch-Übertragungen, die beim Ausbruch in Malaysia nicht beobachtet wurden.

Unklar ist, warum es bei Patienten neben der typischen Nipah-Enzephalitis manchmal zu einer respiratorischen Symptomatik und effizienten Virusausscheidung über respiratorische Sekrete kommt, während andere nur klinische Zeichen einer Enzephalitis zeigen und, wie man annimmt, keine Viren übertragen. Möglicherweise spielen die in dieser Arbeit beobachteten Variabilitäten in der Ephrin B2 Expression in verschiedenen Individuen (siehe Ergebnisse Abb. II.22) hierbei eine Rolle. Dieser Aspekt wurde bislang noch nicht betrachtet, da die Untersuchungen zur Rezeptor-Rolle von Ephrin B2 in der Regel in permanenten Zelllinien, also Tumorzellen, durchgeführt wurden, und in Tumorzellen Ephrin normalerweise hoch reguliert ist (Adams, 2002; Hafner et al., 2004), so dass immer ausreichende (maximale) Mengen an NiV-Rezeptoren vorhanden sind. Die Verwendung von primären humanen Bronchial-Epithelzellen weist nun zum ersten Mal auf individuelle Unterschiede in der

Rezeptorexpression hin, die wahrscheinlich auch *in vivo* vorhanden sind. Da die Menge des Rezeptors ausschlaggebend für den Erfolg der Infektion in HBEpC ist (weniger Ephrin B2 bei Donor 3 – schlechtere Infektion; siehe Ergebnisse Abb. II.24), könnte man vermuten, dass Unterschiede in der Ephrin B2-Expression *in vivo* zu Differenzen in der Infizierbarkeit des Bronchialepithels bei verschiedenen Patienten führen. Vergleichsuntersuchungen der Ephrin-Menge an anderen Abschnitten der Lunge (Trachea und alveoläre Zellen; siehe Anhang Abb. A.2 und Abb. A.4) weisen außerdem darauf hin, dass auch innerhalb des Respirationstrakts Unterschiede in der Ephrin-Expression bestehen. Die trachealen Epithelzellen zeigen ein ähnliches Ephrin-Profil wie die Bronchial-Epithelzellen von Donor 1 und 2, d.h. sehr große Rezeptormengen. In Übereinstimmung damit, dass höhere Ephrin B2-Level die Vermehrung von NiV begünstigen, zeigten die Infektionsexperimente dann auch eine sehr effiziente NiV-Infektion in den trachealen Epithelzellen (siehe Anhang Abb. A.3). In den alveolären Epithelzellen hingegen konnte kein Ephrin nachgewiesen werden, obwohl Escaffre und Kollegen 2013 gezeigt hatten, dass in SAEC (*small airway epithelial cells*) Ephrin B2 vorhanden ist. Dabei wurden sogar zweifach höhere Expressionslevel an Ephrin B2 als in NHBE- (*normal human bronchial epithelial cells*) Zellen gefunden. Somit ist davon auszugehen, dass sich auch in tieferen Lungenabschnitten die Ephrin-Profile von Donor zu Donor unterscheiden. Abhängig vom Donor und somit abhängig von der Menge an Ephrin-Rezeptoren auf der Oberfläche der primären Zielzellen im Respirationstrakt, kommt es wahrscheinlich zu einer mehr oder weniger effizienten Vermehrung von NiV im Epithelgewebe, wobei noch nicht genauer untersucht ist, ob die Ephrin-Profile in voll ausdifferenzierten Epithelzellen Unterschiede in gleichem Ausmaß zeigen. Dafür sprechen jedoch unsere ersten Untersuchungen in PBEpC, in denen wir keine massiven Unterschiede zwischen sub-konfluenten, konfluenten und ausdifferenzierten ALI (*air-liquid-interface*)-Kulturen feststellen konnten (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass die Ephrin-Rezeptorexpression in verschiedenen Menschen unterschiedlich ist. Dies könnte die Kinetik der NiV-Vermehrung im Respirationstrakt maßgeblich bestimmen und damit die Pathogenese bzw. die Wahrscheinlichkeit einer Virusübertragung von Mensch zu Mensch entscheidend beeinflussen.

IV. Material

IV.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	Riedel-de Haen, Seelze
Acrylamid (Rotiphoese Gel 30% Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bakto-Agar	BD Bioscience, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	MP Biomedicals, Eschwege
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
CytoBuster™ (Proteinextraktionsreagenz)	Novagen, Madison, USA
DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
(di)- Natrium-EDTA	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA Ladder Mix (DNA Längenstandard)	Fermentas, St. Leon-Rot
Essigsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Ethlyendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Fungizone® Antimycotic	Gibco BRL, Eggenstein
Giemsa- Lösung	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Riedel-de Haen, Seelze
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kollagen Typ I (<i>rat tail</i>)	BD Biosciences
L-Cystein	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol 4-88	Calbiochem, San Diego, USA
N,N,N', N''-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biorad, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchloracetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Prestained Protein Marker (broad range)	NEB, Frankfurt a.M.
Proteaseinhibitor-Mix	Calbiochem, USA
Protein A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rainbow Marker	GE Healthcare, München
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sucrose	Serva, Heidelberg
Sulfo-NHS-SS-Biotin	Pierce, USA
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
TWEEN 20	Serva, Heidelberg
Whatman- Filterpapier	Schleicher und Schuell, Dassel

IV.2 Antikörper

IV.2.1 Primärantikörper

anti- HA H6908 aus Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti- HA, H9658 aus Maus	Sigma-Aldrich, Steinheim
(beide anti-HA erkennen das Influenza HA-Epitop YPYDVPDYA)	
anti-Zytokeratin (basisch) aus Maus	Acris Antibodies, Herford
anti-Zytokeratin (sauer) aus Maus	Acris Antibodies, Herford
anti-E-Cadherin aus Maus	BD Bioscience, Heidelberg
anti-ZO-3 aus Kaninchen	Milipore, Darmstadt
anti-NiV-Serum aus Meerschweinchen (gp4)	Dr. Heinz Feldmann, Hamilton, Kanada

IV.2.2 Sekundärantikörper

Anti-Meerschweinchen-IgG-AlexaFluor 568 aus Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Kaninchen-IgG-AlexaFluor 568 aus Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Maus-IgG Alexa Fluor 488 aus Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Maus-IgG-IRDye 800 aus Ziege	Rockland, Gilbertsville, USA

IV.3 Enzyme

Protease XIV	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
dNTPs	Fermentas, St. Leon Rot
RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon Rot
Reverse Transkriptase (H-Minus Revert Aid)	Fermentas, St. Leon Rot
<i>recombinant porcine</i> TNF-alpha	ProSpec, Israel

IV.4 Inhibitoren

E64d (Cysteinprotease-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, Steinheim
NS134P (Cathepsin B-Inhibitor)	zur Verfügung gestellt von Dr. N. Schaschke, Bielefeld

IV.5 Kits

InnoZyme™ Cathepsin B Activity Assay Kit, Fluorogenic	Calbiochem, USA
InnoZyme™ Cathepsin L Activity Assay Kit, Fluorogenic	Calbiochem, USA
Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit	Pierce, USA
QIAfilter® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
One Step RT PCR Kit	Qiagen, Hilden
Passagekit 4	ProVibro, Berlin
SYBR Green qPCR Kit	Fermentas, St. Leon-Rot

IV.6 Medien

Mowiol (wird zum Eindeckeln von Immunfluoreszenz- Präparaten verwendet)

2,4 g Mowiol 4-88

6 g Glycerin

6 ml dH₂O

(über Nacht quellen lassen)

2 ml 0,2 M Tris, pH 8,5

Ansatz unter ständigem Rühren bei 50-60°C lösen, anschließend für 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren, den Überstand mit DABCO (10 % w/v) versetzen und aliquotieren. Lagerung bei -20 °C.

IV.6.1 Wachstumsmedium für eukaryotische Zellen

DMEM (<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>)	Gibco BRL, Eggenstein
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
AEGM (<i>airway epithelial cell growth medium</i>), ready-to-use	Promocell, Heidelberg

IV.6.2 Wachstumsmedien für prokaryotische Zellen

LB-Medium	10 g NaCl
	5 g Hefeextrakt
	10 g Pepton aus Casein
	ad 1l mit dH ₂ O
LB-Agar	3,75 g Bacto-Agar
	ad 250 ml LB-Medium

IV.7 Plasmide

pCAGGS-NiV-F _{tag} (kodiert für eine mit dem Influenza-HA-Epitop (YPYDVPDYA) versehene Version des Fusionsproteins (NiV-F))	hergestellt von Dr. M. Moll, Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-NiV-Gtag (kodiert für eine mit dem Influenza-HA-Epitop versehene Version des Glykoproteins)	Dr. M. Czub, Winnipeg, Kanada
pCAGGS-Ephrin B2	umkloniert von Lena Thiel, Institut für Virologie, Marburg

IV.8 Puffer

DNA Probenpuffer (6x)	0,25% BPB
	40% Sucrose
PBS _{def} pH 7,4 (<i>phosphate buffered saline, deficient</i>)	8,0 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,15 g Na ₂ HPO ₄
	0,2 g KH ₂ PO ₄
	ad 1l mit dH ₂ O
PBS ⁺⁺	PBS _{def} mit MgCl ₂ und CaCl ₂
RIPA- Puffer (<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)	1% Triton X-100
	1% DOC
	0,1% SDS
	1:20 Trasylol
	0,15 M NaCl
	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
	10 mM EDTA
	Ad 100 ml dH ₂ O
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	10 g SDS
	30 g Tris
	144 g Glyzin
	ad 1l dH ₂ O
SDS-Probenpuffer (2x)	1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
	2 ml 10% SDS
	1 ml Glyzerin
	0,1 ml 2% BPB
	0,4 ml dH ₂ O

TBE-Puffer (10x), pH 8,3	121,2 g	Tris
	51,4 g	Borsäure
	3,7 g	EDTA
	ad 1l dH ₂ O	
Transferpuffer	5,8 g	Tris
	2,9 g	Glyzin
	200 ml	EtOH
	ad 1l dH ₂ O	

IV.9 Oligonukleotide

Random hexamers

Fermentas, St. Leon Rot

Die nachfolgenden Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg hergestellt

Bezeichnung	Sequenz
ICAM-1_for	5'- TGT CCT GCC AGC CAC C-3'
ICAM-1_rev	5'- CTG GCC ACG TCC AGT TTC-3'
VCAM-1_for	5'- GTG GAG ATC TAC TCT TTC CC-3'
VCAM-1_rev	5'- CAT GGG CAT TTC AGA CAC AGG TTT TC-3'
Occludin_for	5'- CTA CAC AAC TGG CGG CGA-3'
Occludin_rev	5'- TCT CCA ACC ATC TTC TTG ATG TG-3'
Ephrin B2_for	5'- GAA AAT ACC CCT CTC CTC AAC T -3'
Ephrin B2_rev	5'- CTT CGG AAC CGA GGA TGT TGT TC -3'
Ephrin B3_for	5'- AGC CTG GAG CCT GTC TAC TGG A -3'
Ephrin B3_rev	5'- CAT GGG CAT TTC AGA CAC AGG TTT TC -3'
NiV 5 diag	5'- ATC AAT CGT GGT TAT CTT GA -3'
NiV 3 diag	5'- CAG CCA GTT CTG CAA CTT GAT C -3'
Tubulin-α for	5'- TCA GTG CGT TAC TCA CCT CG -3'
Tubulin-α rev	5'- AAT CAG AGT GCT CCA GGG TG -3'

IV.10 Transfektionsreagenzien

FuGENE-HD Transfection Reagent

Roche, Mannheim

IV.11 Zellen

IV.11.1 Eukaryotische Zellen

HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie, Ephrin B2-negativ
PBEpC	<i>porcine bronchial epithelial cells</i> , primäre Bronchial-Epithelzellen aus dem Schwein
HBepC	<i>human bronchial epithelial cells</i> , primäre Bronchial-Epithelzellen aus dem Mensch, ProVitro, Berlin
PTEpC	<i>porcine tracheal epithelial cells</i> , primäre Tracheal-Epithelzellen aus dem Schwein
HTEpC	<i>human tracheal epithelial cells</i> , primäre Tracheal-Epithelzellen aus dem Mensch, ProVitro, Berlin

IV.11.2 Prokaryotische Zellen

Escherichia coli, Stamm XL 1 Blue

Stratagene, Heidelberg

IV.12 Viren

Nipahvirus (NiV)-Isolat aus humanem Hirngewebe

Dr. J. Cardoso, Malaysia

V. Methoden

V.1 Molekularbiologische Methoden

V.1.1 Hitzeschocktransformation

Die Aufnahme von frei vorliegender DNA durch prokaryotische Zellen bezeichnet man als Transformation. Von Natur aus sind nur wenige Zellen kompetent, d.h. sie sind in der Lage fremde, frei vorliegende DNA aufzunehmen. Jedoch ist es möglich verschiedene Stämme des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) durch Behandlung mit Chemikalien (z.B. Tfb-Puffer) kompetent zu machen. Durch einen Hitzeschock wird die Effizienz der DNA-Aufnahme gesteigert. Eine Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien erfolgt über eine plasmidkodierte Antibiotika-Resistenz.

5 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* des Stammes XL1 Blue angeimpft und über Nacht (ü.N.) bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml dieser Übernachtskultur (ÜNK) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 40 ml Tfb-Puffer 1 gelöst und die Bakterien für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 8 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml Tfb-Puffer 2 aufgenommen. Je 100 µl dieser Suspension wurden in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und bei –80°C gelagert.

Für die Transformation wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut. Jeweils 1µg Plasmid-DNA wurde zu 100 µl Bakterien-Suspension gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 sec einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und danach wiederum für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 500 µl LB-Medium dazu pipettiert und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 50 µl der Suspension wurde auf eine Antibiotika-enhaltenen (z.B. Ampicillin) LB-Agarplatte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Für eine Übernachtskultur wurde eine Kolonie von dieser Platte zum Animpfen von 5 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) verwendet und ü.N. bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

V.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mittels des QIAfilter[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen) aus 100 ml Übernachtskultur (ÜNK). Hierbei werden die Bakterienzellen durch alkalischen Lyse aufgeschlossen. Die Lysate werden dann neutralisiert und durch Filtration von Zellresten und chromosomaler DNA befreit. Anschließend wird das Lysat über eine Säulenmatrix gegeben, an die die Plasmid-DNA unter Niedrigsalzbedingungen bindet. Nach mehrmaligem Waschen wird die Plasmid-DNA mit einem hypertonen Puffer eluiert, mit Isopropanol gefällt und im Anschluss mit EtOH gewaschen, um Salzreste zu entfernen, und letztlich in dH₂O aufgenommen.

Für die Plasmidaufreinigung wurde eine Bakterienkultur zum Animpfen einer Vorkultur (4 ml LB-Medium mit Antibiotikum) verwendet. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C auf dem Schüttler wurde eine Hauptkultur (100 ml LB-Medium mit Antibiotikum) mit der Vorkultur hergestellt. Am nächsten Tag wurde dann die Plasmid-DNA nach dem Protokoll des Kit-Herstellers isoliert.

V.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

DNA-Fragmente zeigen aufgrund ihrer Größe ein unterschiedliches Laufverhalten im Agarosegel. Agarose ist ein Polysaccharid aus Rotalgen und kann nach Aufkochen Quervernetzungen ausbilden. Diese Vernetzungen ermöglichen, dass große DNA-Fragmente langsamer durch das Gel laufen können als kleinere. Durch Anlegung einer Spannung von 120 V für ca. 1 h wandern die negativen DNA-Moleküle zur Anode. Der, in die DNA interkalierende, Stoff Ethidiumbromid wird dem Gel zugefügt und ermöglicht die Detektion der DNA nach Anregung mit UV-Licht. Der mitgeführte Marker dient als Größenstandard.

Für ein 2 % iges Gel wurden 2 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach kurzem Abkühlen wurden 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml Stocklösung) zugegeben. Spezielle Gelschlitten wurden nun mit der Agarose befüllt, wobei ein Kamm für die Aussparungen der Probenaschen sorgt. Das erstarrte Gel wurde in die Gelkammer (Bio Rad) gesetzt, diese mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllt und anschließend der Kamm vorsichtig entfernt. Die mit 6x Probenpuffer (PP) versehenen Proben wurden in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für ungefähr 1 h. Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht am Geldoc (Bio Rad).

V.1.4 RNA Isolierung

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde ein kommerziell erhältliches Kit (RNeasy® Mini Kit) der Firma Qiagen verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Hersteller-Angaben. Damit die RNA aus den Zellen freigesetzt wird, müssen die Zellmembranen mechanisch und chemisch aufgebrochen werden. Im Kit enthalten sind Säulen mit einer Kieselgel-Membran. Bei hoher Salzkonzentration, welche durch verschiedenen Puffer ermöglicht werden, wird die RNA reversibel an diese Membran gebunden. Nach mehrmaligen Waschen und Trocknen der Membran kann dann die gebunden RNA durch Zugabe von Wasser (Dipol) von der Membran gelöst werden.

Zur RNA-Isolierung wurden HBepC und PBepC, abhängig vom Experiment, auf Kollagen beschichtete 6well-Platten oder auf Costar-Transwell-Filter ausgesät. Im Anschluss erfolgte entweder eine Stimulation mit TNF α , eine Transfektion mit verschiedenen Plasmiden oder die Infektion mit NiV. Nach der Stimulation, Transfektion oder Infektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen in 350 μ l RLT-Puffer mit β -ME (1:100) abgekratzt und in ein Eppendorf Cup überführt. Als nächstes erfolgte die Zugabe von einem Volumenanteil 100 % Ethanol (350 μ l, v/v). Bei Infektionsversuchen ist es nach diesem Schritt erlaubt die Proben aus dem BSL4-Labor auszuschleusen. Dieses Gemisch wurde anschließend auf eine Kieselgel-Membran-Säule gegeben und jeweils 15 sec bei 8500 rpm zentrifugiert. Als nächstes erfolgten mehrere Waschschrte. Zunächst wird die Säule mit 700 μ l RW1-Puffer versetzt und anschließend bei 8500 rpm für 15 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und es folgten zwei Waschschrte mit 500 μ l RPE-Puffer (versetzt mit 100 % Ethanol) und anschließender Zentrifugation (erst 15 sec und dann 2 min bei 8500 rpm). Um sicherzustellen, dass die Membran ausreichend getrocknet ist, wurde nach dem letzten Waschschrte, die trockene Säule noch einmal bei 15000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Eluation erfolgte mit 30 μ l dH₂O. Die Gesamt-RNA wurde photometrisch quantifiziert (NanoDrop) und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

V.1.5 RT-PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Allgemeinen wird ein gewünschter, durch einen *forward* und einen *reverse* Primer begrenzter DNA-Abschnitt, selektiv amplifiziert. Bei den

Primern handelt es sich um Oligonukleotide, die an einzelsträngiger DNA hybridisieren und für die Polymerasen als Startpunkt für die Synthese der DNA dienen. Neben der Ausgangs-DNA (*template*) und den Primern enthält ein PCR-Ansatz Desoxynukleotide (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase.

Bei der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist in einem PCR-Ansatz zusätzlich das Enzym Reverse Transkriptase enthalten, welches es ermöglicht RNA als *template* zu nutzen und diese in einem vorgeschalteten Inkubationsschritt (50 °C für 30 min) in cDNA umzuschreiben. Die *HotStart*-DNA-Polymerase, welche ebenfalls in dem Ansatz vorhanden ist, ist aufgrund der niedrigen Temperatur inaktiv. Erst durch einen weiteren Inkubationsschritt (15 min), welcher vor der anschließenden PCR geschaltet ist, wird sie bei 95 °C aktiviert. In der ersten Phase der darauf folgenden PCR wird die DNA denaturiert, anschließend können die Primer bei deutlich niedrigeren Temperaturen an die Einzelstränge der DNA binden (*Annealing*) und schließlich wird die DNA, ausgehend von den Primern zum Doppelstrang ergänzt (*Elongation*). Die Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts erfolgt durch einen sich wiederholenden Zyklus dieser Schritte.

In dieser Arbeit wurde das OneStep RT-PCR Kit von Qiagen verwendet. Es wurde wie folgt ein Mastermix hergestellt:

RNase freies H ₂ O	28 µl
RT-Puffer	10 µl
dNTP-Mix	2 µl
<i>forward</i> Primer (10 nM)	1 µl
<i>reverse</i> Primer (10 nM)	1 µl
Enzym Mix (RT, <i>HotStart</i> -DNA-Polymerase)	2 µl
RNase-Inhibitor-Mix	1 µl
<i>template</i> RNA	5 µl

Die Zyklusparameter waren wie folgt:

Reverse Transkription (vor dem 1.Zyklus)	50 °C	30 min
Polymeraseaktivierung und Denaturierung (vor dem 1.Zyklus)	95 °C	15 min

Beginn der 35 Zyklen

Denaturierung	94 °C	30 sec
<i>Annealing</i>	57 °C	1 min
<i>Elongation</i>	72 °C	1 min
Synthese nach dem letzten Zyklus	72 °C	10 min
	4 °C	∞

Nach der PCR erfolgte die Auftrennung der DNA in einem 2 %igen Agarosegel zur Überprüfung der Größe der Fragmente und der Reinheit (siehe V.1.4.).

V.1.6 cDNA-Synthese

Um die isolierte RNA für die quantitative qPCR verwenden zu können, musste sie zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Das Enzym Reverse Transkriptase vermittelt die Umschreibung der vorliegenden RNA-Sequenz in eine entsprechende cDNA. Es benötigt dazu geeignete Temperatur-Bedingungen und Salzkonzentrationen sowie Nukleotide und unspezifische Primer (*random hexamer*-Primer).

Pro Reaktion benötigt man 100 ng der Ausgangs-RNA für die qRT. Die entsprechende Menge wird in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 2 µl *random hexamer* Primern und RNase-freiem dH₂O auf 12,5 µl Endvolumen aufgefüllt. Um eventuelle Sekundärstrukturen aufzubrechen wird der Ansatz bei 65 °C für 5 min inkubiert und anschließend für 10 min auf Eis gekühlt. Für die reverse Transkription wurde eine Reverse Transkriptase der Firma Fermentas verwendet (Revert Aid H-Minus RT). Pro Reaktion werden 0,5 µl Reverse Transkriptase in 4,5 µl des mitgeliefertem 5 x Puffer mit 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 0,5 µl RNase Inhibitor eingesetzt. Zu den RNA Proben wurden jeweils 7,5 µl des Reverse Transkriptase-Mix pipettiert um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten. Die Proben

wurden dann in einem PCR-Cycler 10 min bei 25 °C und 60 min bei 42 °C inkubiert. Abschließend wurden die Proben für 10 min auf 70 °C erhitzt.

V.1.7 Quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR)

Die *Real-Time*-PCR funktioniert im Prinzip wie eine standardmäßige PCR (V.1.5). Der Unterschied hier ist, dass die Auswertung nicht nach 40 Zyklen erfolgt (Endpunkt). Hier kann durch die Zugabe eines DNA-bindenden, fluoreszierenden Farbstoffs, die neu amplifizierte DNA nach jedem Zyklus detektiert werden. In dieser Arbeit wurde als interkalierender Farbstoff *SYBR Green* verwendet. Dieses bindet an doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes mit jedem Zyklus ansteigt. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Somit wird in der qPCR in Echtzeit die ansteigende Fluoreszenz, und somit die ansteigende DNA nach jedem Zyklus gemessen. Der Anstieg der Fluoreszenz wird, um die Hintergrundfluoreszenz korrigiert, für jeden einzelnen Zyklus dargestellt und lässt sich im linearen Abschnitt der aufsteigenden Kurve prinzipiell direkt mit der Menge an vorliegender DNA korrelieren (Woo et al. 1998; Morrison et al. 1998).

In diesem System ist es allerdings nicht möglich zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten zu unterscheiden. Deshalb muss nach jeder qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Hierbei wird die Temperatur langsam und kontinuierlich immer um 0,3 °C erhöht (60 °C bis 95 °C). Dadurch wird die DNA aufgeschmolzen, das *SYBR Green* freigesetzt und es ist keine Fluoreszenz mehr messbar. Bei der Schmelzkurvenanalyse korreliert somit die spezifische Länge des Amplifikats mit einer Fluoreszenzabnahme bei einer spezifischen Temperatur für das jeweilige Fragment. Die Höhe der erhaltenen Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

Für diese Arbeit wurde der Maxima *SYBR Green* Mastermix der Fima ThermoFisher verwendet. Pro Probe wurden jeweils Triplikate untersucht. In jedem Reaktionsansatz befinden sich 100 ng cDNA (V.1.6.), die spezifischen *forward* und *reverse* Primer (jeweils 100 pmol/l) und 2x QuantiFast *SYBR Green* PCR Master Mix. Das Reaktionsgemisch wird mit dH₂O auf 25 µl aufgefüllt. Die Reaktion lief in einem *Real-Time*-PCR-Cycler (Step One, Applied Biosystems) ab.

initialer Aktivierungsschritt	95 °C	5 min
Beginn von 40 Zyklen		
Denaturierung	95° C	30 sec
<i>Annealing</i>	53°C	30 sec
Elongation*	72°C	1 min

(* hier erfolgt die Messung der Fluoreszenz)

Nach Ablauf der 40 Zyklen wurde erfolgt die schrittweise (jeweils um 0,3 °C) Erhöhung der Temperatur von 60 °C auf 95 °C (Schmelzkurven-Analyse).

V.1.8 Auswertung der qPCR

Bei der Auswertung der qPCR wurde die Software des Step One Quantitative PCR Systems verwendet. Für die Auswertung der qPCR wurde der C_t -Wert der einzelnen Proben verwendet. Der C_t -Wert beschreibt, ab welchem Zyklus der PCR die Fluoreszenz, welche durch Bindung von *SYBR Green* an doppelsträngige DNA entsteht, das erste Mal über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Je größer die Ausgangsmenge an mRNA im Zelllysate ist, umso größer ist die anteilige Menge an cDNA pro 100 ng Reaktionsansatz. Je mehr cDNA vorhanden ist, desto mehr doppelsträngige DNA wird neu amplifiziert und umso früher steigt die Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz. Das bedeutet, mit zunehmender mRNA-Menge wird der C_t -Wert kleiner. Um sicher zu stellen, dass das in allen Proben die gleiche Menge an Ausgangsmaterial war, muss die mRNA der Proben auf eine interne Kontrolle bezogen werden, hier α Tubulin. Diese interne Kontrolle wird nicht durch z.B. die Stimulation mit $TNF\alpha$ beeinflusst. Das bedeutet, dass sie in alle Proben ähnlich sein sollte. Um nun Differenzen in den Mock-behandelten und stimulierten bzw. infizierten Proben zu finden, wurden alle auf α Tubulin normalisiert. Das bedeutet der C_t -Wert der jeweiligen Tubulin-Kontrolle wurde vom C_t -Wert der Probe abgezogen werden (ΔC_t). Um einen Effekt der Stimulation bzw. Infektion beschreiben zu können, muss anschließend die jeweilige Mock-Probe subtrahiert werden ($\Delta\Delta C_t$). In dieser Berechnung wird vorausgesetzt, dass sich die Anzahl der amplifizierten Fragmente nach jedem Zyklus verdoppelt (Nedelman et al. 1992). Das bedeutet, eine Verminderung des C_t -Wertes um eins, heißt eine Verdopplung der cDNA.

Da dies in jedem neuen Zyklus geschieht, muss man für die *fold change*-Berechnung (x-fache Erhöhung über Mock) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnen.

Formel:

$$C_{t \text{ Probe}} - C_{t \text{ interne Kontrolle}} = \Delta C_t$$

$$\Delta C_{t \text{ stimuliert bzw. infiziert}} - \Delta C_{t \text{ Mock}} = \Delta\Delta C_t$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{fold change (x-fache Erhöhung über Mock)}$$

V.1.9 Stimulation der Zellen mit TNF α

Für einige bronchiale Epithelzellen ist bereits beschrieben, dass sie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf ihrer Zelloberfläche nach Stimulation mit proinflammatorischen Proteinen wie TNF α oder Interferon γ hochregulieren können (Rosseau et al., 2000). Um zu überprüfen, ob es sich bei den isolierten Zellen um funktionelle Epithelzellen handelt, wurden Stimations-Experiment mit TNF α durchgeführt.

Die Zellen wurden auf *12well-Transwell-Filter* (Costar) ausgesät und nach Erreichen einer 100 % Konfluenz erfolgte ein Mediumwechsel. Dafür wurde dem Medium rekombinantes Schweine-TNF α (100 ng/ml; ProSpec) zugegeben. Dabei wurden die Zellen sowohl von der apikalen, als auch von der basalen Seite mit TNF α stimuliert. Nach einer bzw. vier Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen in RLT + 1% β -Mercaptoethanol (β -ME) abgekratzt. Im Anschluss erfolgte eine RNA-Isolation (siehe V.1.4), cDNA-Synthese (V.1.6) und anschließend eine qPCR (V.1.8).

V.2 Zellbiologische Methoden

V.2.1 Zellkultur permanenter Zelllinien

In dieser Arbeit wurden Nierenepithelzellen aus der afrikanischen Meerkatze (Vero-Zellen) sowie wie eine humane Zervixkarzinom-Zelllinie (HeLa) verwendet.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Fa. Greiner unter sterilen Bedingungen kultiviert. Als Zellkulturmedien wurde *Dulbecco's modification of Eagle's medium* (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und L-Glutamin verwendet. Um Kontaminationen mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden wurde dem Medium 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml

Streptomycin zugesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz mussten die adhärenenten Zellen zur Passage vom Untergrund abgelöst werden. Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen und anschließend mit 4 ml Trypsin/EDTA kurz inkubiert. Nachdem sich die Zellen abrundeten und langsam vom Untergrund lösten, wurden etwa 3 ml der Trypsin/EDTA-Lösung abgegossen und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert bis sie sich vollständig abgelöst hatten. Es folgte die Zugabe des entsprechenden Kulturmediums, wobei das darin enthaltene FCS das Trypsin/EDTA inaktiviert. Durch Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension wurde die Vereinzelung der Zellen gewährleistet. Für eine 1:10 Passage wurden in eine neue Zellkulturflasche 19 ml Medium und 1 ml der resuspendierten Zellen überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens. Die Passage der Zellen erfolgte zweimal pro Woche.

V.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl einer Zellsuspension kann mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Zunächst wurde die Zählkammer mit Ethanol gesäubert. Dann wurde das Deckglas vorsichtig auf den Glasschlitten geschoben bis Newton'sche Ringe zu sehen waren. An den Rand des Deckglases wurde mit einer Pipette ca. 6 µl der zuvor verdünnten Zellsuspension gegeben, so dass sich die Flüssigkeit durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Glasschlitten saugen konnte. Anschließend wurden unter dem Mikroskop die Zellen der vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl pro ml erhielt man mit folgender Formel:

$$\text{Mittelwert} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

V.2.3 Isolierung von *porcine bronchial epithelial cells* (PBEpC) nach Bals et al., 2004

Im Gegensatz zu humanen, primären Bronchial-Epithelzellen sind porcine Bronchial-Epithelzellen nicht kommerziell erhältlich und müssen selbst isoliert werden. Die Etablierung wurde nach einem abgeänderten Protokoll zur Isolierung von humanen Epithelzellen von Bals (Bals et. al, 2004; siehe Abb. V.1) durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der PBEpC wurden Schweinelungen vom Marburger Schlachthof besorgt. Im Labor wurde zunächst außerhalb der Sterilbank grob das

umliegende Lungengewebe entfernt. Erst im Anschluss wurden die frei präparierten Bronchien unter der Sterilbank weiter behandelt. Dabei wurden die Hauptbronchien zunächst vom umgebenden Bindegewebe befreit und die tiefer gelegenen Nebenbronchien entfernt. Dann wurden die Bronchien zweimal mit sterilem PBS_{def} gewaschen und in sterile Bechergläser überführt. Nun wurden die Bronchien ü.N. bei 4 °C mit Ausgangsmedium inkubiert. Dieses Medium enthält DTT (0,5 mg/ml), welches dazu dient, den Mukus in den Bronchien abzubauen.

Ausgangsmedium: (500 ml)

- 500 ml DMEM
- P/S [Penicillin 100 U/ml; Streptomycin 100 µg/ml]
- Fungizone (Amphotericin B) [2,5 µg/ml]
- Kanamycin [50 µg/ml]
- Enrofloxacin [10 µg/ml]
- Clotrimazol [1µg/ml]
- DTT [0,5 mg/ml]

Am Folgetag wurde das Medium entfernt und die Bronchien einem Proteaseverdau unterzogen. Dafür wurde dem Ausgangsmedium Protease XIV (Protease aus *Streptomyces griseus*; 1 mg/ml) zugegeben und die Bronchien ü.N. bei 4 °C inkubiert. Dieser Schritt erleichtert durch die Vereinzelung der Zellen die spätere Isolierung der PBEpC. Dann wurden die Bronchien einmal mit PBS_{def} gewaschen und mit einem Skalpell longitudinal geöffnet. Die Zellen der luminalen Seite wurden vorsichtig mittels Skalpell dreimal vorsichtig abgekratzt und in sterilem PBS_{def} aufgenommen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm für 10 min bei 22 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml *airway epithelial cell growth medium* (AEGM) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun durch ein Gaze-Netz gefiltert, dies erleichtert die Vereinzelung der Zellen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Kollagen-beschichtete Costar-Flaschen (25cm² Zellkulturflaschen) gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag musste ein Mediumwechsel erfolgen und anschließend muss jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt werden bis die notwendige Konfluenz der Zellen erreicht wurde.

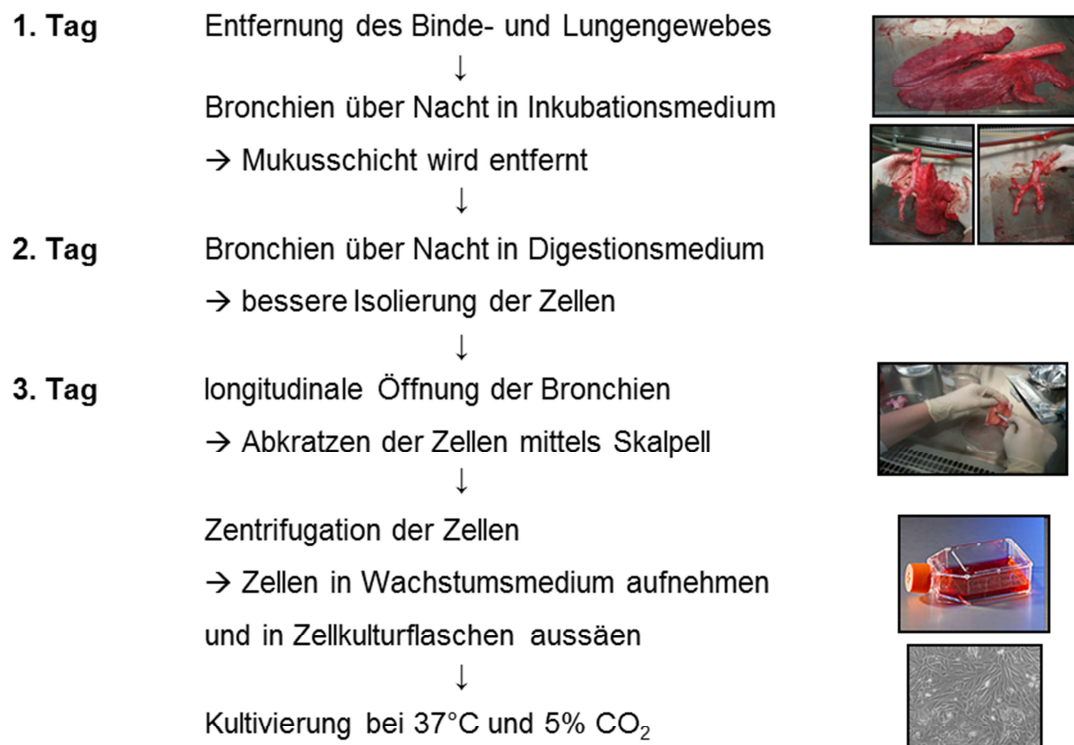


Abb. V.1: Schematischer Ablauf der Zellisolierung.

Die Zellen können insgesamt viermal passagiert werden. Um die Zellen jedoch für später Versuche verwenden zu können, ist es möglich sie einzufrieren. Dafür wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 % mit dem Passage-Kit 4 (ProVitro) abgelöst. Die Konfluenz darf 70 % nicht überschreiten, weil es sonst zu einer irreversible Kontaktinhibition kommen würde. Die Folgen wären, dass sowohl das Wachstum als auch die Vermehrung der Zellen (Zellproliferation) unterbleibt. Die abgelösten Zellen werden bei 260 x g bei 22 °C für 7 min zentrifugiert und der Überstand wird vorsichtig abgenommen. Das Zellpellet wird in 1 ml AEGM und 15 % Glycerin aufgenommen und in 2 ml Einfrierröhrchen überführt und eingefroren.

V.2.4 Auftauen von primären Zellen

Die HBEPc (ProVitro, Berlin) wurden als eingefrorene Aliquots bestellt und die Auftauprozedur wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Ablauf wurde auch für die isolierten und eingefrorenen PBEpC übernommen. Bei dieser Methode ist es

wichtig schnell zu arbeiten, damit die Zellmembranen nicht durch Eiskristalle beschädigt werden.

Die gefrorenen Aliquots (ca. 500.000 Zellen) werden im Wasserbad durch schnelles, mehrmaliges Schwenken angetaut und dann unter der Sterilbank geöffnet. Sofort erfolgt die Zugabe von 500 µl warmen AEGM und die Zellsuspension wird in Zentrifugenröhrchen überführt. Durch die spezielle Beschichtung adherieren die Zellen nicht an der Wand des Röhrchens. Die Einfrierröhrchen werden nochmal mit 2 ml AEGM ausgespült um sicher zu stellen, dass alle Zellen in das Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Anschließend erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 260 x g für 7 min. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 10 ml AEGM aufnehmen. Jeweils 5 ml der Zellsuspension wird in eine mit Kollagen beschichtete 25cm² Costar-Zellkulturflasche überführt und dann im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zum nächsten Tag inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 h um nicht anhaftende Zellen zu entfernen, danach erfolgt ein Mediumwechsel alle 2-3 Tage bis die Zellen 70 % Konfluenz erreicht hatten. Die Zellen können anschließend mit dem Passagekit abgelöst und auf *Transwell*-Filter, auf Kollagen beschichtete *6well*-Platten oder auf Kollagen beschichtete Costar-Zellkulturflaschen ausgesät werden.

V.2.5 Passagieren von primären Zellen

Ein Nachteil primärer Zellen ist oft, dass einmal abtrypsinierte Zellen nicht wieder richtig anwachsen, bzw. dass die neu angewachsenen Zellen durch den Trypsinschock nicht mehr alle Oberflächenproteine exprimieren. Um dies zu verhindern wurde in dieser Arbeit das Passagekit 4 der Firma ProVitro verwendet. Dafür wurden die adhärenenten Zellen nach Herstellerangaben einmal mit dem beigefügten PBS (5 ml (25cm²) bzw. 15 ml (75cm²)) gewaschen und im Anschluss mit *detachment solution* (2ml (25cm²) bzw. 6 ml (75cm²)) versetzt. Die humanen Bronchial-Epithelzellen benötigen ca. 5 min, die porcinen Brochial-Epithelzellen ca. 10 min im Inkubator bis sie sich vollständig abgelöst haben. Um wirklich alle Zellen vom Boden der Kulturflasche abzulösen, wurde noch einmal mit *detachment solution* nachgespült und anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Um die *detachment solution* vollständig zu entfernen, erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 250 x g für 7 min. Der klare Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in AEGM aufgenommen, um die Zellen entweder zu passagieren oder wegzufrieren.

V.2.6 Transfektion von primären Zellen mit FuGENE-HD

Die Transfektion von primären Zellen benötigt spezielle Transfektionsreagenzien, da Standard-Transfektionsmethoden wie z.B. mit Lipofectamin 2000 zu toxisch für die primären Zellen sind. Weiterhin ist die Transfektions-Effizienz mit diesen Methoden oftmals zu gering. Die Firma Promega hat speziell für die Transfektion von schwer transfizierbaren Zellen das Transfektionsreagenz FuGENE-HD entwickelt. Dabei handelt es sich um ein nicht-liposomales polyanionisches Lipid, welches auch eine effiziente Transfektion von nahezu 100 % konfluenten Zellen ermöglicht.

Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden die primären humanen bzw. porcinen Zellen auf Kollagen-beschichteten *6well*-Platten ausgesät und solange kultiviert bis sie eine Konfluenz zwischen 70-90 % erreicht hatten. Pro Ansatz wurden 100 µl OptiMEM vorgelegt und mit insgesamt 2 µg DNA und 6 µl FuGENE-HD versetzt. Dieser Transfektionsansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung von FuGENE-HD an die Plasmid-DNA zu gewährleisten. In der Zwischenzeit erfolgte ein Mediumwechsel mit *Airway Epithelial Cell Growth Medium* (PromoCell), dieses Medium enthält kein FCS. Für die Transfektion von permanenten Zelllinien (HeLa-Zellen) ist es nicht notwendig serumfreies Medium zu verwenden, da das FuGENE-HD Transfektions-Reagenz nicht, wie andere Transfektions-Reagenzien mit dem FCS interagiert. Nach der Inkubationszeit wurde das DNA-FuGENE-Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel ist hierbei nicht notwendig.

V.2.7 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Um die Spaltung des NiV-Fusionsproteins in den primären Bronchial-Epithelzellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit verschiedenen Cathepsin-Inhibitoren für 17 h inkubiert. Dabei handelte es sich zum einen um den Cathepsin B spezifischen Inhibitor NS134P (zur Verfügung gestellt von Dr. N. Schaschke, Bielefeld) und um den kommerzielle erhältlichen Inhibitor E64d (Calbiochem), welcher alle Cysteinproteasen hemmt. Beide Inhibitoren sind membrangängig. Die primären Zellen wurden mit FuGENE-HD und pCAGGS-NiV-F transfiziert. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgt 6 h nach der Transfektion. Dafür wurde das Transfektionsgemisch abgenommen und durch neues Medium, welches die Inhibitoren enthielt (NS134P mit einer Endkonzentration von 10 µM und E64d mit 20 µM), ersetzt. Um

eine unspezifische Reaktion des Lösungsmittels auszuschließen, wurde jeweils ein *6well* mit DMSO in mit dem äquivalenten Volumen an Inhibitoren behandelt.

V.2.8 „Doppeltransfektion“ von primären Zellen

Um mehrere Plasmide zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den primären Zellen zur Expression zu bringen, wurden „Doppeltransfektions-Versuche“ durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein Ephrin B2-kodierendes Plasmid mittels FuGENE-HD in die primären Zellen gebracht (siehe V.2.6.1) und für 4 h im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium entfernt und durch neues AEGM ersetzt. Es erfolgte dann eine zweite Transfektion mit zwei Plasmiden, welche für die zwei Oberflächenproteine NiV-F beziehungsweise NiV-G kodieren. 22 h (erste Transfektion) bzw. 18 h (zweite Transfektion) p.t. erfolgte ein Fusionsassay. Mittels GIEMSA-Färbung wurde die Synzytienformation visualisiert und damit der Einfluss von überexprimierten Ephrin auf die Fusion untersucht.

V.2.9 Fusionsassay

Zellen, die die beiden Glykoproteine F und G sowie den zellulären NiV-Rezeptor Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 exprimieren, können mit ihren Nachbarzellen fusionieren. Dies führt zur Bildung vielkerniger Riesenzellen (Synzytien), die im Lichtmikroskop betrachtet werden können.

Die primären Zellen wurden mit FuGENE-HD (siehe V.2.6.1) und den für die NiV-Glykoproteine kodierenden Plasmiden kotransfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen und anschließend mit 70 %igem Ethanol für 10 min bei RT fixiert. Danach wurden 0,5 ml einer 1:10 mit dH₂O verdünnten Giemsa-Lösung auf die Zellen gegeben und die Zellkerne für 30 min bei RT gefärbt. Nach der Inkubationszeit wurde die Giemsa-Lösung abgenommen, der Zellrasen mehrfach mit dH₂O gewaschen und die Platte ü.N. bei RT getrocknet. Schließlich konnten die Präparate mit einem Lichtmikroskop analysiert und die Synzytienbildung dokumentiert werden.

V.2.10 Modifizierter Fusionsassay („Overlay-Assay“) zum Nachweis der Rezeptor-Expression auf der Oberfläche von primären Zellen

Um den Nachweis zu erbringen, dass sowohl die selbst isolierten, als auch die kommerziell erhältlichen primären Zellen NiV-Rezeptoren exprimieren, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die viralen Proteine NiV-F und NiV-G die Formation von mehrkernigen Riesenzellen (Synzytien) vermitteln können, wenn auf umgebenden Nachbarzellen die viralen Rezeptoren Ephrin B2 und /oder Ephrin B3 exprimiert werden. Dafür wurden Ephrin B2/B3-negative HeLa-Zellen mit NiV-F und NiV-G-kodierenden Plasmiden transfiziert und für 22 h bei 33°C inkubiert, um zu gewährleisten, dass genügend virale Proteine auf der Oberfläche exprimiert werden. Da die HeLa-Zellen den Rezeptor nicht exprimieren kommt es nicht zur Bildung von Synzytien. Die NiV-F- und NiV-G-exprimierenden HeLa-Zellen wurden dann mit Trypsin/EDTA abgelöst und die Zellen mit der Neubauer-Zellzählkammer gezählt, um im Anschluss dieselbe Zellzahl auf die verschiedenen primären Zellen geben zu können. Das Medium, der auf Kollagen-beschichteten 6well-Platten gewachsen primären Zellen, wurde abgenommen und anschließend mit verschiedenen Zellzahlen von NiV-F- und NiV-G-exprimierenden HeLa-Zellen überschichtet. Im Anschluss wurde mit AEGM auf 2 ml aufgefüllt und für 15 h bzw. 90 min bei 33 °C inkubiert. Um die Bildung der Synzytien sichtbar machen zu können wurden die Zellen anschließend mit Ethanol (100 %) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit GIEMSA-Lösung (1:10 in Wasser) für 30 min inkubiert.

Die Abb. V.2 zeigt schematisch den Ablauf des modifizierten Fusionsassays.

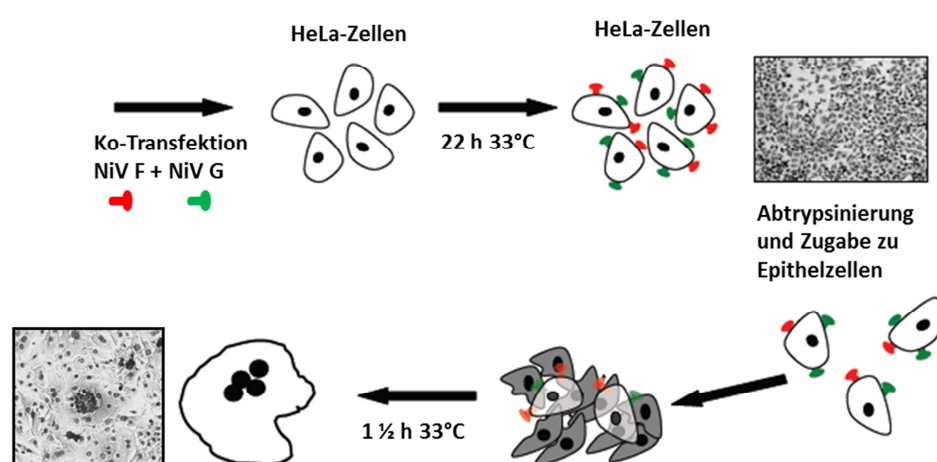


Abb. V.2: Schematischer Ablauf des indirekten Nachweises der funktionellen Rezeptorexpression in PBEpC und HBEpC mittels „Overlay-Fusionsassay“ (modifiziert nach Lena Thiel, 2008 und Stephanie Erbar, 2010).

V.2.11 Kultivierung von primären Zellen auf Filtermembranen

In der Lunge liegen Epithelzellen nicht als sub-konfluente Kultur vor, sondern sie sind dicht gepackt und bilden untereinander Kontakte aus, welche es verhindern, dass z.B. Pathogene durch das Epithelium gelangen. Bei diesen Kontakten handelt es sich um *tight (TJ)* bzw. *adherent junctions (AJ)*. Damit die primären Zellen einen polarisierten Phänotyp ausbilden können, müssen sie auf *Transwell*-Filtermembranen kultiviert werden. Dabei handelt es sich um poröse Membranen, die es ermöglichen, dass die Zellen von der basalen Seite mit Medium versorgt werden. Hierbei ist es nicht notwendig, dass die Membranen mit Kollagen beschichtet sind.

In dieser Arbeit wurden Costar-*Transwell*-Filter genutzt (*12well* bzw. *6well*-Filter) mit jeweils einer Porengröße von 0,4 μM und einer Filtermembran, welche aus Polyester besteht. Die Membranen müssen vor Aussäen der Zellen für 30 min bei 37 °C mit AEGM equilibriert werden. Im Anschluss wird das Medium entfernt und durch neues AEGM (300 μl apikal und 500 μl basal für *12wells* bzw. 1,5 ml apikal und 2,5 ml basal für *6well*-Filter) ersetzt. Die primären Zellen werden mit Passagekit 4 (siehe V.2.5) vom Boden der Zellkulturflasche (25 cm^2 -Flasche) abgelöst und anschließend abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml AEGM aufgenommen und jeweils 83 μl (*12well*-Filter) bzw. 167 μl (*6well*-Filter) der Zellsuspension pro Einsatz gegeben. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel und danach alle zwei Tage bis die Zellen eine 100 % Konfluenz erreicht haben.

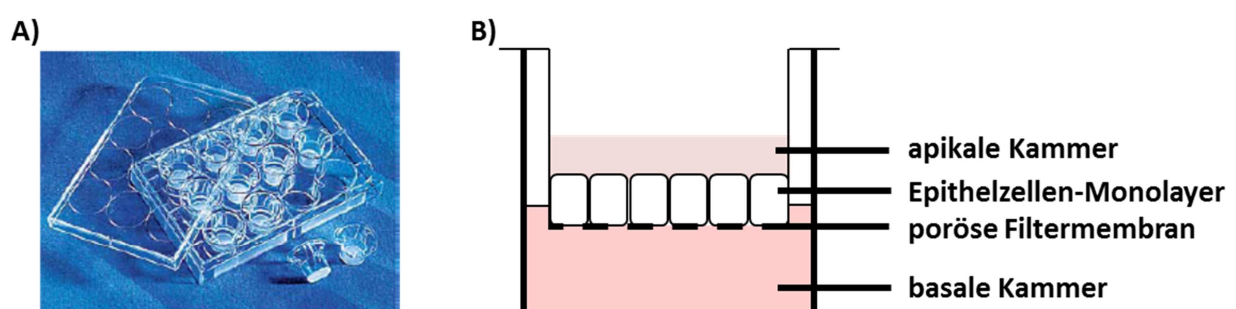


Abb. V.3: Costar-*Transwell*-Filter (A) und schematischer Aufbau (B) des *Transwell*-Filter-Systems zur Kultivierung von polarisierten Epithelzellen.

V.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

V.3.1 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts von Zelllysaten wurde der Bicinchoninsäure (BCA)-Test angewendet. Bei diesem Test bilden die Proteine im Lysat bei der Biuret-Reaktion mit Kupfer (Cu^{2+})-Ionen einen Komplex aus, wobei die Cu^{2+} -Ionen reduziert werden. Dann bildet die Bicinchoninsäure mit diesen Ionen einen Farbkomplex aus, dessen Intensität mit dem Proteingehalt korreliert und sich im Photometer oder ELISA-Reader bestimmen lässt. Durch den Vergleich der Messwerte der Proben mit einer Standardkurve, die aus Proben mit einem bekannten Proteingehalt erstellt wird, lässt sich der Proteingehalt ermitteln.

In dieser Arbeit wurde das Mikro BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce) verwendet. Hierfür wurden die Zellen mit CytoBuster lysiert und anschließend bei 14000 rpm für 7 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für weitere Untersuchungen auf Eis gelagert. In eine 96well-Platte wurde nun in Doppelbestimmung je 150 µl einer 1:5 und einer 1:10 Verdünnung des Zelllysats gegeben. Als Leerwert dienten 150 µl des zur Zelllyse eingesetzten CytoBuster Reagenz. Zusätzlich wurde nach Herstellerangaben die Standardreihe pipettiert. Die Komponenten A, B und C des Kits wurden im Verhältnis 25:24:1 gemischt und davon 150 µl zu den einzelnen Ansätzen gegeben. Nach vorsichtigem Schütteln wurden die Proben für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung in einem ELISA-Reader (Microplate Autoreader, Bio-Tek Instruments) bei einer Wellenlänge von 562 nm.

V.3.2 Cathepsin-Aktivitätsassay

Mit dem Cathepsin-Aktivitätsassay kann man die Aktivität einer Protease, in dieser Arbeit der Cathepsine B und L, über eine von ihr spezifisch katalysierte Substratspaltung nachweisen. Hierbei dient ein Fluoreszenz-markiertes Peptid als Substrat, dessen Fluoreszenzemission intramolekular unterdrückt wird (*quenching*). Nach enzymatischer Hydrolyse werden Fluoreszenzdonor und -akzeptor räumlich voneinander getrennt und die emittierte Fluoreszenz kann dann mit geeigneten Messgeräten detektiert werden (*dequenching*). In dieser Arbeit sollte die Aktivität der beiden Cysteinproteasen Cathepsin B und Cathepsin L in den primären Zellen bestimmt werden. Es wurden zwei kommerziell erhältliche Kits (InnoZyme™ Cathepsin Activity Assay Kit, Fluorogenic, Calbiochem)

verwendet. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers. Alle Komponenten wurden direkt in einer schwarzen *96well*-Messplatte gemischt und die Reaktionszeiten betrugen für Cathepsin B 35 min und für Cathepsin L 1 h 30 min. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Nachweis der Aktivität lag dieser Methode folgendes Prinzip zu Grunde: Beide Kits beinhalten jeweils ein synthetisches Peptid, welches als Substrat für die jeweilige Cathepsinprotease dient. Für Cathepsin B ist das Z-Arg-Arg-AMC und für Cathepsin L wird Z-Phe-Arg-AMC benutzt. Beide Peptide besitzen am C-Terminus eine 7-Amino-4-methyl-coumarin-Gruppe (AMC), welches die fluorogene Gruppe darstellt. Am N-Terminus hingegen ist eine Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Z). Nach Spaltung des Peptids absorbiert die AMC-Gruppe Licht mit einer Wellenlänge von 360-380 nm, die Emission des Lichts liegt bei 440-460 nm. Je höher die Aktivität des entsprechenden Cathepsins in den Lysaten, desto mehr Substrat wird gespalten und dementsprechend mehr Fluoreszenz ist messbar. Somit dient die Fluoreszenz als Nachweis für die Aktivität der Protease.

V.3.4 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation können lösliche Proteine aus einem Proteingemisch, z.B. einem Zelllysat selektiv mit Hilfe von spezifischen Antikörpern isoliert werden. Die Präzipitation des Protein-Antikörper-Komplex erfolgt dann durch Protein A-Sepharose, welches spezifisch an den Fc-Teil des Antikörpers bindet. Bei Protein A-Sepharose handelt es sich um einen Bestandteil der Zellwand aus *Staphylococcus aureus*. Durch die Kopplung des Protein A an Sepharose-Beads kann der Gesamtkomplex durch Zentrifugation vom Lysat getrennt werden.

Ein konfluenten Zellrasen einer *6well*-Platte wurde einmal mit PBSdef gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zelllyse mit 500 µl RIPA-Puffer (1:100 PI) für 30 min auf Eis. Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber in den Puffer gekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden für 45 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Zur Fällung des NiV-Ftag wurde der Antikörper H6908 (anti-HA-Tag) 1:500 zu dem Lysat zugesetzt und der Ansatz ü.N. bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst die in dH₂O gequollene Protein A-Sepharose dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen und dann 50 %ig in RIPA-Puffer (mit 1:100 Protease-Inhibitor, PI) aufgenommen. Von diesem Gemisch wurden 40 µl pro Ansatz

zugefügt und die Proben für 45 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Proteine wurde die Protein A-Sepharose im Anschluss dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Sepharose-Pellet in 20 µl 2x Probenpuffer (PP) mit 4 % β -ME aufgenommen und die gefällten Proteine durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min von der Protein A-Sepharose abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 7 min konnten die Proben im SDS-Gel (siehe V.3.5) aufgetragen werden. .

V.3.5 SDS-PAGE

Mit der diskontinuierlichen Natrium-Dodecylsulfat (SDS)- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihrer Massenunterschiede auftrennen (Laemmli, 1970). Zunächst wird das Proteingemisch mit SDS-Probenpuffer versetzt und so durch das Detergenz SDS alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Jedes SDS-Anion bindet an zwei Aminosäurereste des Proteins, sodass dem Protein eine negative Ladung verliehen wird, die ungefähr proportional zu seiner Masse ist. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wird dem Probenpuffer β -ME zugesetzt.

Für die Auftrennung werden chemisch inerte Polyacrylamid-Gele verwendet. Diese bestehen aus Poren, deren Größe durch das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt wird und die wie Molekularsiebe wirken. Da alle Proteine durch das SDS negativ geladen sind, trennen sie sich nur ihrer Größe nach auf, wobei kleinere Proteine schneller durch die Poren des Gels gelangen als große. Durch die Verwendung eines niedriger konzentrierten Sammelgels wird das gleichzeitige Einlaufen aller Proteine ins Trenngel sichergestellt. Ein mitgeführter Größenstandard (Prestained Protein Marker) ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts der einzelnen Proteine.

Zunächst wurde die Gelapparatur zusammengebaut: Hierfür wurden eine große und kleine Glasplatte mit absolutem EtOH gereinigt, getrennt durch Abstandshalter zusammengesetzt und in den Gießständer eingebaut. Dann wurden die Lösungen für das Trenngel und Sammelgel, jeweils ausreichend für 2 Gele, wie folgt angesetzt:

	12% iges Trenngel (pH 8,8)	3,75 %iges Sammelgel (pH 6,8)
H ₂ O	2,4 ml	3,4 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	3 ml	-
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	-	0,6 ml
30% Acrylamid	3,6 ml	0,6 ml
TEMED	20 µl	10 µl
10% APS	80 µl	40 µl

Direkt nach Zugabe von TEMED und APS zum Trenngel wurden ca. 3,4 ml der Trenngellösung zwischen die Glasplatten gegossen und zur Gewährleistung einer ebenen Oberfläche mit dH₂O abgegossen. Im Anschluss wurden TEMED und APS zur Sammelgellösung gegeben und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde ein Kamm mit den Probestaschen luftblasenfrei eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in eine Keutz-Miniprotein-Gelkammer gesetzt und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Nach Entfernen des Kammes wurden die Proben in die vorher gespülten Taschen pipettiert und eine Spannung von 150 V angelegt. Wenn die blaue Farbbande des Probenpuffers aus dem Gel herausgelaufen war, wurde die Elektrophorese gestoppt.

V.3.6 Proteintransfer auf Nitrozellulose (Elektroblotting)

Nach Auftrennung im SDS-Gel (V.3.5) können die durch das gebundene SDS negativ geladenen Proteine mittels Elektroblotting auf Nitrozellulose (NC)- Membran übertragen werden. Nach Anlegen einer Spannung wandern die Proteine in Richtung Anode. Dabei binden sie irreversibel an die NC-Membran, auf der sie durch Antikörper nachgewiesen werden können (V.3.7).

Für das Semi-Dry-Blot-Verfahren nach Khyse-Andersen (1984) wurden das SDS-Gel, die NC-Membran sowie Whatman-Filterpapiere für ca. 5 min in Transferpuffer inkubiert. Im Anschluss wurde der Blot zwischen zwei Kohleplatten luftblasenfrei geschichtet. Die benötigte Stromstärke für den Proteintransfer ist proportional zur Fläche des Gels und

beträgt 0,8 mA/cm². Damit alle Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-200 kDa übertragen werden, wurde für 1 h geblottet. Nach erfolgtem Transfer wurde die NC-Membran mit 5 % igem Milchpulver (in PBS_{def}) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Absättigung erfolgte für 45 min bis ü.N. bei 4°C auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran kurz mit PBS_{def} und dann 3x für 5-10 min mit PBS_{def}/0,1% TWEEN 20 gewaschen. Im Anschluss können die Proteine mit Antikörpern nachgewiesen werden. (V.3.7.)

V.3.7. Westernblot mit fluoreszierenden Zweitantikörpern (LiCor-System)

Der Westernblot ermöglicht den Nachweis von Proteinen auf NC-Membranen durch Verwendung von spezifischen Antiseren oder monoklonalen Antikörpern. Diese wiederum werden durch einen Sekundärantikörper detektiert, der gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet und zudem an ein Fluorochrom gekoppelt ist. Auf einem Scanner (*Odyssey infrared imaging system*, Licor) können die Proteinbanden detektiert und mit der dazugehörigen Systemsoftware quantifiziert werden.

Der monoklonale Erstantikörper gegen das HA-Tag (H9658 aus der Maus) wurde 1:1000 mit PBS_{def} verdünnt und von dieser Verdünnung wurde 1 ml auf eine mit EtOH gesäuberte Platte pipettiert. Die abgesättigte NC-Membran wurde mit einer Pinzette vorsichtig bündlings darauf gelegt, für eine Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend 3x für 5 min mit PBS_{def}/0,1 % TWEEN 20 gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper (anti-Maus-IgG /IRDye 800; 1: 10000 mit PBS_{def}) für 45 min bei RT. Nach erneutem Waschen und kurzem Schwenken in PBS_{def} konnte die NC-Membran am *Odyssey infrared imaging system*, Licor gescannt und die fluoreszierenden Proteinbanden detektiert werden. Ein fluoreszierender Proteinmarker (Prestained Protein Marker) diente als Größenstandard.

V.3.8 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Mit Hilfe der indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IF) lassen sich Proteine auf Zelloberflächen und intrazelluläre Proteinen in permeabilisiert Zellen nachweisen. Hierbei bindet ein spezifischer Erstantikörper zunächst an das Protein von Interesse und dann wird dieser

Antigen-Antikörper-Komplex von einem Zweitantikörper, der an ein Fluorochrom wie Rhodamin, FITC oder AlexaFluor (AF)-Farbstoffe konjugiert ist, detektiert. Das so markierte Protein kann dann durch Anregung mit der jeweiligen Wellenlänge am Mikroskop sichtbar gemacht und analysiert werden.

Zellen wurden auf Costar-*Transwell*-Filter ausgesät bis sie eine Konfluenz von 100 % erreicht hatten. Unter der Sterilbank wurden die Filtermembranen mit einem Skalpell aus der Filterhalterung geschnitten und in eine 24well-Platte gelegt. Die Zellen wurden zunächst 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS⁺⁺ wurde überschüssiges PFA mit 0,1 M Glycin in PBS⁺⁺ neutralisiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt mit 0,2 % Triton-X-100 in PBS⁺⁺ für 30 min bei 37 °C. Danach erfolgte ein 1 stündiger Inkubationsschritt mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBSdef zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und ein letzter Waschschrift mit PBS⁺⁺. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde in einer feuchten Kammer, einer mit feuchtem Whatman-Filterpapier ausgelegten Petrischale, durchgeführt. Dazu wurden zunächst 40 µl des in 0,35 % BSA/PBS⁺⁺ verdünnten Erstantikörpers auf Parafilm gegeben, welcher sich in der feuchten Kammer befand, anschließend der Filter mit der Zellseite nach oben gelegt und erneut 60 µl Antikörperlösung auf den Zellrasen pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Filter wieder in die 24well-Platte gelegt und mit PBS⁺⁺ gewaschen. Dann wurden 250 µl des verdünnten Sekundärantikörpers (1:200 in 0,35% BSA/PBS⁺⁺) auf die Zellen gegeben und für 2 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zusätzlich wurde der Kernfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, 1:10000) in die Lösung gegeben. Nach erneutem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Filter zum Entfernen von Salzresten zunächst kurz in dH₂O geschwenkt und dann mit Mowiol auf einen Objektträger luftblasenfrei eingedeckelt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Dunkeln. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M mit Apotome, Zeiss).

V.3.9 Nachweis von NiV-Proteinen in der Immunfluoreszenz

Die auf Filtern polar gewachsene HBEPc und PBEPc wurden im BSL4-Labor mit NiV infiziert (V.4.3 und V.4.4). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und in einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) ü.N. bei 4 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag

wurde das PFA abgenommen und die Filter in einen Zipperbeutel gegeben und erneut mit 4 % PFA versetzt. Zur Desinfektion von außen wurden die Zellen über ein 5 % iges Microchembad aus dem BSL-4 Labor ausgeschleust. Vor Weiterverwendung mussten die Filter eine weitere Nacht bei 4 °C in 4 % PFA inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden die Filter in neue Platten gegeben und zunächst dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Um das überschüssige PFA zu binden, wurden die Filter für 30 min mit DMEM-10 % FCS inkubiert. Als nächstes wurden die Zellen mit Methanol/Aceton (1:1) für 5 min bei -20 °C permeabilisiert und danach erneut dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, wurden die Zellen für 15 min mit 0,1 M Glyzin in PBSdef inkubiert. Für die Detektion von NiV-positiven Zellen wurde ein anti-NiV-Serum aus Meerschweinchen (gp4, 1:500 in PBS⁺⁺/0,35% BSA) verwendet. Die Zellen wurden mit gp4 für 2 h bei 4 °C inkubiert. Dafür wurden die Zellen in eine feuchte Kammer, wie unter V.3.8 beschrieben, gelegt und für zwei Stunden mit dem Serum inkubiert. Im Anschluss wurden die Filter wieder in die Platte zurückgelegt und dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Als zweiten Antikörper wurde ein AlexaFluor 568-konjugierten anti-Meerschweinchen IgG-Serum (1:250) verwendet und die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10.000) gegengefärbt. Auch hier wurden die Filter für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Filter wurden anschließend mit Mowiol eingedeckelt (siehe V.3.8) und am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200M) ausgewertet.

V.4 Virologische Methoden

Alle durchgeführten Infektionsversuche wurden mit NiV im Hochsicherheitslabor (BSL4-Labor) in Marburg durchgeführt.

V.4.1 Virusanzucht

Zur Anzüchtung des hier verwendeten NiV wurden Vero76-Zellen verwendet. Die Vero-Zellen wurden in 175cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen im BSL4-Labor einmal mit PBSdef gewaschen und mit NiV mit einer *multiplicity of infection* (MOI; Viruspartikel/Zelle) von 0,001 infiziert. Die Vero-Zellen wurden mit 7 ml DMEM ohne FCS inokuliert und 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 23 ml DMEM-2 % FCS zum

Infektionsmedium. Um zu gewährleisten, dass alle Zellen infiziert waren und somit mehr Material (Virus) für alle weiteren Experimente zur Verfügung standen, wurden die Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach 48 h war in nahezu allen Zellen ein zytopathischer Effekt (CPE) sichtbar. Jetzt wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und zur Entfernung von Zelltrümmern erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Benutzung bei -80 °C gelagert.

V.4.2 Titerbestimmung einer Virussuspension

Um die Anzahl infektiöser Viren in einer Virussuspension zu ermitteln wurde die Methode der TCID₅₀ (*tissue culture infective dosis*)- Bestimmung verwendet. Als TCID₅₀ wird die höchste Virusverdünnung definiert, die zur Infektion von mindestens 50 % aller Zellkulturen führt, die mit dieser Virusverdünnung beimpft wurden (d.h. mind. 2 von 4).

Die Bestimmung wurde nicht manuell durchgeführt, sondern es wurde ein Pipettier-Roboter (Tecan Freedom EVO® 75) verwendet. Hierfür wurden am Vortag Vero76-Zellen auf 96well-Platten ausgesät in einem Endvolumen von insgesamt 180 µl. Jede Probe wird in einer 4fach Bestimmung untersucht. Im Sicherheitslabor werden dann automatisch 20 µl Virus dazugegeben und auf- und abpipettiert. Nun folgt die Überführung von 20 µl ins nächste well. Dieser Vorgang wird siebenmal wiederholt. Die 96well-Platten werden dann im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 Tage inkubiert. Als Negativkontrolle wird der Überstand von uninfizierten Zellen titriert. Nach 5 Tagen wird am Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet, in welchen wells ein CPE verursacht wurde. Die Virusverdünnung bei der noch mindestens 2 wells einen CPE zeigten wird dann als TCID₅₀/ml angegeben.

V.4.3 Infektion von subkonfluenten primären Zellen

Um die Infizierbarkeit von humanen und porcinen Epithelzellen untersuchen zu können, wurden HBEpC und PBEpC auf Filter ausgesät, bis sie eine Konfluenz von 70 % erreicht hatten. Im BSL4-Labor wurden die Zellen in 500 µl Infektionsmedium (NiV in DMEM ohne FCS) mit einer MOI von 0,5 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die NiV-Stocklösung hatte hierbei einen Titer von 1×10^{10} TCID₅₀/ml und wurde in einer 1:100 Vorverdünnung verwendet. Eine Stunde nach der Infektion wurde das Infektionsmedium abgenommen und die Zellen

wurden mit DMEM mit 2 % FCS weiter inkubiert. 24 h nach Infektion wurden zum einen Durchlichtbilder am Phasenkontrast-Mikroskop gemacht um die Synzytienformation zu detektieren. Weiterhin wurde 24 h p.i. und 48 h p.i. der Überstand von infizierten Zellen abgenommen um den Titer mittels TCID₅₀-Methode zu bestimmen. Zusätzlich wurde 24 h p.i. die RNA aus Mock-infizierten und NiV-infizierten PBEPc und HBEPc isoliert. 48 h p.i. wurden die Zellen mit 4 % PFA für 48 h fixiert und anschließend Immunfluoreszenz durchgeführt (siehe V.3.9).

V.4.4 Infektion von polarisiert gewachsenen Epithelzellen auf *Transwell*-Filtern

Sowohl HBEPc und PBEPc wurden auf 12well-Filtermembranen ausgesät bis sie eine 100 % Konfluenz erreicht hatten. Anschließend wurde jeweils ein Filter zur Bestimmung der Zellzahl mit dem Passagekit 4 abgelöst. Im BSL4-Labor wurden die Zellen mit derselben MOI entweder von der apikalen oder basalen Seite infiziert. Dafür wurde das Wachstumsmedium abgenommen und durch Infektionsmedium (Virusverdünnung in DMEM ohne FCS) ersetzt. Erfolgte die Infektion von der apikalen Seite, so wurden 500 µl des Infektionsmedium in die apikale Kammer gegeben und in die basale Kammer 1 ml DMEM ohne FCS gefüllt. Bei basaler Infektion wurden 1 ml des Infektionsmediums in die basale und 500 µl von DMEM ohne FCS in die apikale Kammer gegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C für 1,5 h zur Virusadsorption inkubiert. Anschließend wurde die Viruslösung abgenommen und die Filter fünfmal mit PBSdef gewaschen, bevor die Zugabe von frischem Medium mit 2 % FCS erfolgte. 24 h, 48 h und 72 h p.i. wurde Medium aus jeder Kammer für die Bestimmung der Virusfreisetzung genommen (TCID₅₀). Weiterhin wurden die Filter 72 h p.i. mit PFA fixiert um Immunfluoreszenz-Analyse durchzuführen (V.3.9).

V.4.5 Infektion der Zellen für die RNA-Isolation

Um in infizierten Zellen eine erfolgreiche Infektion nachweisen zu können, kann neben der Immunfluoreszenz-Analyse auch die Menge an NiV-N-mRNA in den Zelllysaten mittels qRT-PCR gemessen werden und somit quantitativ die Infektion verglichen werden. Weiterhin ist es möglich NiV-N-mRNA im Überstand von infizierten Zellen mittels RT-PCR als Indiz für eine Virusfreisetzung zu detektieren.

Dafür wurden HBepC und PBepC mit NiV infiziert (V.4.3). Für den Nachweis der NiV-N-mRNA im Überstand von infizierten Zellen, wurde 100 µl des Überstandes abgenommen und 350 µl RLT-Puffer + 1% β-ME zugegeben. Im Anschluss wurde zu den Proben 250 µl Ethanol gegeben und alles in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Für die Bestimmung der NiV-N-mRNA-Mengen im Zelllysate wurden die Zellen mit 350 µl RLT-Puffer und 3,5 µl β-ME für 5 min inkubiert, mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 350 µl Ethanol (100 %) wurden die Zellen in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Proben vom Überstand und aus dem Zelllysate konnten dann aus dem BSL4-Labor ausgeschleust und mittels RNeasy®-Kit isoliert werden.

VI Literaturverzeichnis

- AbuBakar S.**, Chang L.Y., Ali A.R., Sharifah S.H., Yusoff K., Zamrod Z. (2004) Isolation and molecular identification of Nipah virus from pigs. *Emerg Infect Dis*, **10**, 2228-2230
- Adams, R.H.** (2002) Vascular patterning by Eph receptor tyrosine kinases and ephrins. *Semin Cell Dev Biol*, **13**, 55-60
- Aguilar, H.C.**, Matreyek, K.A., Choi, D.Y., Filone, C.M., Young, S., and Lee, B. (2007) Polybasic KKR motif in the cytoplasmic tail of Nipah virus fusion protein modulates membrane fusion by inside-out signaling. *J Virol*, **81**, 4520-4532.
- Aguilar, H.C.**, Matreyek, K.A., Filone, C.M., Hashimi, S.T., Levroney, E.L., Negrete, O.A., Bertolotti-Ciarlet, A., Choi, D.Y., McHardy, I., Fulcher, J.A., Su, S.V., Wolf, M.C., Kohatsu, L., Baum, L.G. and Lee, B. (2006) N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry. *J Virol*, **80**, 4878-4889.
- Akache, B.**, Grimm, D., Shen, X., Fuess, S., Yant, S.R., Glazer, D. S., Park, J. and Kay, M.A. (2007) A two-hybrid screen identifies cathepsins B and L as uncoating factors for adeno-associated virus 2 and 8. *Mol Ther*, **15**, 330-339.
- Anonymous.** (1999) Outbreak of Hendra-like virus- Malaysia and Singapore, 1998-1999. *MMWR-Morb-Mortal-Wkly-Rep.*, **48**, 265-269.
- Anonymous.** (1999) Update: outbreak of Nipah virus- Malaysia and Singapore, 1998-1999. *MMWR-Morb-Mortal-Wkly-Rep.*, **48**, 335-337.
- Anonymous.** (2005) Nipah virus outbreak from date palm juice. *Health-Sci-Bull.*, **3**, 1-5
- Anonymous.** (2008) Outbreaks of Nipah virus in Rajbari and Manikgonj, February 2008. *Health-Sci-Bull.*, **6**, 12-13
- Aronson, N.N.** and Barrett, A.J. (1978) The specificity of cathepsin B. Hydrolysis of glucagon at the C-terminus by a peptidyl dipeptidase mechanism. *Biochem J*, **171**, 759-765.
- Aziz, J.**, Olson, J., Lee O.B., Daniels, P., Adzhar, A.B., Bunning, M., Sharihuddin Field, H. and Johara Hopper, P. (1999) Nipah virus infection of animals in Malaysia. *Abst. XIth Int. Cong. Virol., Sydney, Australia*, 38.
- Baici, A.**, Hörler, D., Lang, A., Merlin, C. and Kissling, R. (1995) Cathepsin B in osteoarthritis: zonal variation of enzyme activity in human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis*, **54**, 281-288
- Baici, A.** (1998) Inhibition of extracellular matrix-degrading endopeptidases: problems, comments and hypotheses. *Biol Chem*, **379**, 1007-1018.
- Baici, A.**, Lang, A., Zwicky, K. and Muntener, K. (2005) Cathepsin B in osteoarthritis: uncontrolled proteolysis in the wrong place. *Semin Arthritis Rheum*, **34**, 24-28.
- Balharay D.**, Sexton K., Bérubé K.A. (2008) An *in vitro* approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane, *Toxicology*, **244**, 66-76
- Bals R.**, Beisswenger C., Blouquit S., Chinnet T. (2004) Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *J Cyst Fibros*, **3 Suppl 2**, 49-51
- Baron, M.D.** and Barrett, T. (2000) Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in

growth and transcription of viral RNAs. *J Virol*, **74**, 2603-2611.

Barrett, A.J. and Kirschke, H. (1981) Cathepsin B, Cathepsin H and cathepsin L. *Methods Enzymol*, **80**, 535-561.

Barrett, A.J. (1986) The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta*, **45**, 1363-1374

Barrett, A.J. (1992) Cellular proteolysis. An overview. *Ann N Y Acad Sci*, **674**, 1-15.

Barrett, A.J. (1994) Classification of peptidases. *Methods Enzymol*, **244**, 1-15.

Berhane, Y., Weingartl, H.M., Lopez, J., Neufeld, J., Czub, S., Embury-Hyatt, C., Goolia, M., Copps, J. and Czub, M. (2008) Bacterial infections in pigs experimentally infected with Nipah virus. *Transbound Emerg Dis*, **55**, 165-174.

Bernstein, H.G., Bukowska, A., Dobrowolny, H., Bogerts, B. and Lendeckel, U. (2007) Cathepsin K and schizophrenia. *Synapse*, **61**, 252-253

Bérubé K., Prytherch Z., Job C., Hughes T. (2010) Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology*, **278**, 311-318

Bonaparte, M.I., Dimitrov, A.S., Bossart, K.N., Crameri, G., Mungall, B.A., Bishop, K.A., Choudhry, V., Dimitrov, D.S., Wang, L.F., Eaton, B.T. and Broder, C.C. (2005) Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10652-10657.

Bosch, B.J., Bartelink, W. and Rottier, P.J. (2008) Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide. *J Virol*, **82**, 8887-8890.

Bossart, K.N., Wang, L.F., Eaton, B.T. and Broder, C.C. (2001) Functional expression and membrane fusion tropism of the envelope glycoproteins of Hendra virus. *Virology*, **290**, 121-135

Bossart, K.N., Wang, L.F., Flora, M.N., Chua, K.B., Lam, S.K., Eaton, B.T. and Broder, C.C. (2002) Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins. *J Virol*, **76**, 11186-11198.

Bossart, K.N., McEachern, J.A., Hickey, A.C., Choudhry, V., Dimitrov, D.S., Eaton, B.T. and Wang, L.F. (2007) Neutralization assays for differential henipavirus serology using Bio-Plex protein array systems. *J Virol Methods*, **142**, 29-40.

Bossart K.N., Tachedjian M., McEachern J.A., Crameri G., Zhu Z., Dimitrov D.S., Broder C.C., Wang L.F. (2008) Functional studies of host-specific ephrin-B ligands as Henipavirus receptors. *Virology*, **372**, 357-371

Brix, K., Lemansky, P. and Herzog, V. (1996) Evidence for extracellularly acting cathepsins prohormone processing in the thyroid. *Endocrinology*, **137**, 1963-1974.

Brix, K., Linke, M., Tepel, C. and Herzog, V. (2001) Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid. *Biol Chem*, **382**, 717-725.

Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K. and Jordans, S. (2007) Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, **90**, 194-207

Bruckner K., Pablo Labrador J. Scheiffele P.(1999) EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron*, **22**,511-524

Burri P.H. (2011) Development and growth of the human lung. *Compr Physiol*, **10** (Suppl):1-46

- Bühling, F.**, Gerber, A., Häckel, C., Krüger, S., Köhnlein, T., Brömme, D., Reinhold, D., Ansorge, S. and Welte, T. (1999) Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **20**, 612-619
- Bühling, F.**, Röcken, C., Brasch, F., Hartig, R., Yasuda, Y., Saftig, P., Brömme, D. and Welte, T. (2004) Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis. *Am J Pathol*, **164**, 2203-2216.
- Calain, P.** and Roux, L. (1993) The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol*, **67**, 4822-4830.
- Cao X.**, Surma M.A., Simons K. (2012) Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell Res*, **22**, 793-805
- Centers for Disease Control and Prevention**, (1999) Outbreak of Hendra-like virus – Malaysia and Singapore, 1998-1999. *JAMA*, **281**, 1787-1788.
- Chan, Y.P.**, Chua, K.B., Koh, C.L., Lim, M.E. and Lam, S.K. (2001) Complete nucleotide sequences of Nipah virus isolated from Malaysia. *J Gen Virol*, **82**, 2151-2155.
- Chandran, K.**, Sullivan, N.J., Felbor, U., Whelan, S.P. and Cunningham, J.M. (2005) Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science*, **308**, 1643-1645.
- Chen, J.M.**, Yu, M., Morrissy, C., Zhao, Y.G., Meehan, G., Sun, Y.X., Wang, Q.H., Zhang, W., Wang, L.F. and Wang, Z.L. (2006) A comparative indirect ELISA for the detection of henipavirus antibodies based on a recombinant nucleocapsid protein expressed in Escherichia coli. *J Virol Methods*, **136**, 273-276.
- Choi, C.** (2004) Nipah's return. The lethal "flying fox" virus may spread between people. *Sci Am*, **291**, 21A, 22.
- Chow, V.T.**, Tambyah, P.A., Yeo, W.M., Phoon, M.C. and Howe, J. (2000) Diagnosis of nipah virus encephalitis by electron microscopy of cerebrospinal fluid. *J Clin Virol*, **19**, 143-147.
- Chua, K.B.**, Bellini, W.J., Rota, P.A., Harcourt, B.H., Tamin, A., Lam, S.K., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Zaki, S.R., Shieh, W., Goldsmith, C.S., Gubler, D.J., Roehrig, J.T., Eaton, B., Gould, A.R., Olson, J., Field, H., Daniels, P., Ling, A.E., Peters, C.J., Anderson, L.J. and Mayh, B.W. (2000) Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*, **288**, 1432-1435.
- Chua, K.B.**, Lam, S.K., Tan, C.T., Hooi, P.S., Goh, K.J., Chew, N.K., Tan, K.S., Kamarulzaman, A. and Wong, K.T. (2000) High mortality in Nipah encephalitis is associated with presence of virus in cerebrospinal fluid. *Ann Neurol*, **48**, 802-805.
- Chua, K.B.**, Goh, K.J., Wong, K.T., Kamarulzaman, A., Tan, P.S., Ksiazek, T.G., Zaki, S.R., Paul, G., Lam, S.K. and Tan, C.T. (1999) Fatal encephalitis due to Nipah virus among pigfarmers in Malaysia. *Lancet*, **354**, 1257-1259.
- Ciancanelli, J.** and Basler, C.F. (2006) Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *J Virol*, **80**, 12070-12078.
- Crennell, S.**, Takimoto, T., Portner, A. and Taylor, G. (2000) Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Biol*, **7**, 1068-1074.
- Cui W.**, Li L.X., Sun C.M., Wen Y., Zhou Y., Dong Y.L., Liu P. (2010) Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Braz J Med Biol Res*, **43**, 330-337
- Daniels, P.**, Ksiazek, T. and Eaton, B.T. (2001) Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra virus infection. *Mikrobes Infect*, **3**, 289-295.
- Davy A.**, Gale N.W., Murray E.W. (1999) Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev*, **13**, 3125-3135

- DeBuysscher B.L.**, de Wit E., Munster V.J., Scott D., Feldmann H., Prescott J. (2013) Comparison of the pathogenicity of Nipah virus isolates from Bangladesh and Malaysia in the Syrian hamster. *PLoS Negl Trop Dis*, **7**, e2024
- de Wit E.**, Prescott J., Falzarano D., Bushmaker T., Scott D., Feldmann H., Munster V.J. (2014) Foodborne transmission of nipah virus in Syrian hamsters. *PLoS Pathog*, **10**, 3
- Diederich, S.**, Moll, M., Klenk, H.D. and Maisner, A. (2005) The nipah virus fusion protein is cleaved within the endosomal compartment. *J Biol Chem*, **280**, 29899-29903.
- Diederich, S.** (2007) Untersuchungen zur proteolytischen Aktivierung des Nipahvirus. Dissertation am Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg.
- Diederich, S.**, Thiel, L. and Maisner, A. (2008) Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry. *Virology*, **375**, 391-400.
- Diederich S.**, Sauerhering L., Weis M., Altmeyen H., Schaschke N., Reinheckel T., Erbar S., and Maisner A. (2012) Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells is mediated by cathepsin B within the endosomal-recycling compartment, *J Virol*, 6628-11
- Dutch, R.E.**, Jardetzky, T.S. and Lamb, R.A. (2000) Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis. *Biosci Rep*, **20**, 597-612.
- Earp, L.J.**, Delos, S.E., Park, H.E. and White, J.M. (2005) The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, **285**, 25-66.
- Eaton, B.T.**, Wright, P.J., Wang, L.F., Sergeyev, O., Michalski, W.P., Bossart, K.N. and Broder, C.C. (2004) Henipaviruses: recent observations on regulation of transcription and the nature of the cell receptor. *Arch Virol Suppl*, 122-131.
- Eaton, D.N.** and Tavares, F.X. (2005) Design of cathepsin K inhibitors for osteoporosis. *Curr Top Med Chem*, **5**, 1639-1675.
- Eaton, B.T.**, Broder, C.C. and Wang, L.F. (2005) Hendra and Nipah viruses: pathogenesis and therapeutics. *Curr Mol Med*, **5**, 805-816.
- Ebert, D.H.**, Deussing, J., Peters, C. and Dermody, T.S. (2002) Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J Biol Chem*, **277**, 24609-24617.
- Egea J.**, Klein R. (2007) Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol*, **217**, 230-238
- Elshabrawy H.A.**, Fan J., Haddad C.S., Ratia K., Broder C.C., Caffrey M., Prabhakar B.S. (2014) Identification of a Broad-Spectrum Antiviral Small Molecule against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Ebola, Hendra, and Nipah Viruses by Using a Novel High-Throughput Screening Assay. *J Virol*, **88**, 4353-4365
- Erbar S.**, Maisner A. (2010) Nipah virus infection and glycoprotein targeting in endothelial cells. *Virol J*, **7**, 305
- Escaffre O.**, Borisevich V., Carmical J.R., Prusak D., Prescott J., Feldmann H., Rockx B. (2013) Henipavirus pathogenesis in human respiratory epithelial cells. *J Virol*, **87**, 3284-3294
- Escaffre O.**, Borisevich V., Rockx B. (2013) Pathogenesis of Hendra and Nipah virus infection in humans. *J Infect Dev Ctries*, **7**, 308-311
- Fabes J.**, Anderson P., Brennan C., Bolsover S. (2007) Regeneration-enhancing effects of EphA4 blocking peptide following corticospinal tract injury in adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, **26**, 2496-2505

- Felbor, U.**, Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H.H., Ploegh, H.L., Bronson, R.T. and Olsen, B.R. (2002) Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7883-7888.
- Field, H.**, Young, P., Yob, J.M., Mills, J., Hall, L. and Mackenzie, J. (2001) The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect*, **3**, 307-314.
- Flanagan J.G.**, Vanderhaeghen P. (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci*, **21**, 309-345
- Fogarty, R.**, Halpin, K., Hyatt, A.D., Daszak, P. and Mungall, B.A. (2008) Henipavirus susceptibility to environmental variables. *Virus Res*, **132**, 140-144.
- Folkman J.** (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, **82**, 4-6
- Friedrichs, B.**, Tepel, C., Reinheckel, T., Deussing, J., von Figura, K., Herzog, V., Peters, C., Saftig, P. and Brix, K. (2003) Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest*, **111**, 1733-1745.
- Gale N.W.**, Holland S.J., Valenzuela D.M. (1996) Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron*, **17**, 9-19
- Glazier, K.**, Raghow, R. and Kingsbury, D.W. (1977) Regulation of Sendai virus transcription: evidence for a single promoter in vivo. *J Virol*, **21**, 863-871.
- Gnirss K.**, Kühl A., Karsten C., Glowacka I., Bertram S., Kaup F., Hofmann H., Pöhlmann S. (2010) Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of TMPRSS2 expression. *Virology*, **424**, 3-10
- Gocheva, V.** and Joyce, J.A. (2007) Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle*, **6**, 60-64.
- Godat, E.**, Hervé-Grépinet, V., Veillard, F., Lecaille, F., Belghazi, M., Brömme, D. and Lalmanach, G. (2008) Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide. *Biol Chem*, 2008 Aug 8. [Epub ahead of print]
- Goldsmith, C.S.**, Whistler, T., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Rota, P.A., Bellini, W.J., Daszak, P., Wong, K.T., Shieh, W.J. and Zaki, S.R. (2003) Elucidation of Nipah virus morphogenesis and replication using ultrastructural and molecular approaches. *Virus Res*, **92**, 89-98.
- Goh, K.J.**, Tan, C.T., Chew, N.K., Tan, P.S., Kamarulzaman, A., Sarji, S.A., Wong, K.T., Abdullah, B.J., Chua, K.B. and Lam, S.K. (2000) Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. *N Engl J Med*, **342**, 1229-1235.
- Goris K.**, Uhlenbruck S., Schwegmann-Wessels C., Köhl W., Niedorf F., Stern M., Hewicker-Trautwein M., Bals R., Taylor G., Braun A., Bicker G., Kietzmann M., Herrler G. (2009) Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection. *J Virol*, **83**, 1962-1968
- Guillaume, V.**, Lefeuvre, A., Faure, C., Marianneau, P., Buckland, R., Lam, S.K., Wild, T.F. Deubel, V. (2004) Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR (TaqMan). *J Virol Methods*, **120**, 229-237.
- Gurley, E.S.**, Montgomery, J.M., Hossain, M.J., Bell, M., Azad, A.K., Islam, M.R., Molla, M.A., Carroll, D.S., Ksiazek, T.G., Rota, P.A., Lowe, L., Comer, J.A., Rollin, P., Czub, M., Grolla, A., Feldmann, H., Luby, S.P., Woodward, J.L. and Breiman, R.F. (2007) Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community. *Emerg Infect Dis*, **13**, 1031-1037.
- Hafner, C.**, Schmitz, G., Meyer, S., Bataille, F., hau, P., Langmann, T., Dietmaier, W., Landthaler, M. and Vogt, T. (2004) Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem*, **50**, 490-499.

- Halpin, K.**, Bankamp, B., Harcourt, B.H., Bellini, W.J. and Rota, P.A. (2004) Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay. *J Gen Virol*, **85**, 701-707.
- Halpin, K.**, Hyatt, A.D., Plowright, R.K., Epstein, J.H., Daszak, P., Field, H.E., Wang, L., Daniels, P.W. and the Henipavirus Ecology Research Group (2007) Emerging viruses: coming in on a wrinkled wing and a prayer. *Clin Infect Dis*, **44**, 711-717.
- Harcourt, B.H.**, Tamin, A., Halpin, K., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Bellini, W.J. and Rota, P.A. (2001) Molecular characterization of the polymerase gene and genomic termini of Nipah virus. *Virology*, **287**, 192-201.
- Harcourt, B.H.**, Tamin, A., Halpin, K., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Anderson, L.J., Bellini, W.J. and Rota, P.A. (2000) Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology*, **271**, 334-349.
- Hasenberg M.**, Stegemann-Koniszewski S., Gunzer M. (2013) Cellular immune reactions in the lung. *Immunol Rev*, **251**, 189-214
- Hayman, D.T.**, Suu-Ire, R., Breed, A.C., McEachern, J.A., Wang, L., Wood, J.L. and Cunningham, A.A. (2008) Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *PLoS ONE*, **3**, e2739.
- Herath N.I.**, Boyd A.W. (2010) The role of Eph receptors and ephrin ligands in colorectal cancer. *Int J Cancer*, **126**, 2003-2011
- Hérault M.**, Schaffner F., Augustin H.G. (2006) Eph receptor and ephrin ligand-mediated interactions during angiogenesis and tumor progression. *Exp Cell Res*, **312**, 642-650
- Holzman L.B.**, Marks R.M., Dixit V.M. (1990) A novel immediate-early response gene of endothelium is induced by cytokines and encodes a secreted protein. *Mol Cell Biol*, **10**, 5830-5838
- Hossain, M.J.**, Gurley, E.S., Montgomery, J.M., Bell, M., Carroll, D.S., Hsu, V.P., Formenty, P., Croisier, A., Bertherat, E., Faiz, M.A., Azad, A.K., Islam, R., Molla, M.A., Ksiazek, T.G., Rota, P.A., Comer, J.A., Rollin, P.E., Luby, S.P. and Breiman, R.F. (2008) Clinical presentation of nipah virus infection in Bangladesh. *Clin Infect Dis*, **46**, 977-984.
- Huang, I.C.**, Bosch, B.J., Li, W., Farzan, M., Rottier, P.M. and Choe, H. (2006) SARSCoV, but not HCoV-NL63, utilizes cathepsins to infect cells: viral entry. *Adv Exp Med Biol*, **581**, 335-338.
- Hyatt, A.D.**, Zaki, S.R., Goldsmith, C.S., Wise, T.G. and Hengstberger, S.G. (2001) Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect*, **3**, 297-306.
- Jane, D.T.**, Morvay, L., Dasilva, L., Cavallo-Medved, D., Sloane, B.F. and Dufresne, M.J. (2006) Cathepsin B localizes to plasma membrane caveolae of differentiating myoblasts and is secreted in an active form at physiological pH. *Biol Chem*, **387**, 223-234.
- Jedezsko, C.** and Sloane, B.F. (2004) Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem*, **385**, 1017-1027.
- Kaletsky, R.L.**, Simmons, G. and Bates, P. (2007) Proteolysis of the Ebola virus glycoproteins enhances virus binding and infectivity. *J Virol*, **81**, 13378-13384.
- Kashiwazaki, Y.**, Na, Y.N., Tanimura, N. and Imada, T. (2004) A solid-phase blocking ELISA for detection of antibodies to Nipah virus. *J Virol Methods*, **121**, 259-261.
- Khan S.U.**, Gurley E.S., Hossain M.J., Nahar N., Sharker M.A., Luby S.P. (2012) A randomized controlled trial of interventions to impede date palm sap contamination by bats to prevent nipah virus transmission in Bangladesh. *PLoS One*, **7**, 8
- Kirschke, H.** and Barrett, A.J. (1987) Chemistry of lysosomal proteases. In: *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown* (Glauman, H. and Ballard, F.J., eds), Academic Press, New York, pp. 193-238.

- Korff T.**, Dandekar G., Pfaff D., Füller T., Goettsch W., Morawietz H., Schaffner F., Augustin H.G. (2006) Endothelial ephrinB2 is controlled by microenvironmental determinants and associates context-dependently with CD31. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 468-474
- Kos, J.**, Sekirnik, A., Premzl, A., Zavasnik Bergant, V., Langerholc, T., Turk, B., Werle, B., Golouh, R., Repnik, U., Jeras, M. and Turk, V. (2005) Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res*, **306**, 103-113.
- Kullander K.**, Klein R.(2002)Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 475-486
- Lamb, R.A.** and Kolakofsky, D. (2001) *Paramyxoviridae*: The viruses and their replication. In *Fields Virology*. (Knipe, DM, Howley, PM, Griffin, DE, Lamb, RA, Martin, MA, Roizman, B, Straus, SE, eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **4th ed**, 1305-1340.
- Lackmann M.**, Boyd A.W. (2008) Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity? *Sci Signal*, **1**,
- Lamb, R.A.**, Paterson, R.G. and Jardetzky, T.S. (2006) Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology*, **344**, 30-37.
- Lamp B.**, Dietzel E., Kolesnikova L., Sauerhering L., Erbar S., Weingartl H., Maisner A. (2013) Nipah virus entry and egress from polarized epithelial cells. *J Virol*, **87**, 3143-54
- Leppert, M.**, Rittenhouse, L., Perrault, J., Summers, D.F. and Kolakofsky, D. (1979) Plus and minus strand leader RNAs in negative strand virus-infected cells. *Cell*, **18**, 735-747.
- Li M.**, Embury-Hyatt C., Weingartl H.M. (2010) Experimental inoculation study indicates swine as a potential host for Hendra virus. *Vet. Res.*, **41**, 33
- Linke, M.A.**, Herzog, V. and Brix, K. (2002) Trafficking of lysosomal cathepsin B-green fluorescent protein to the surface of thyroid epithelial cells involves the endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Sci*, **115**, 4877-4889.
- Linke, M.**, Jordans, S., Mach, L., Herzog, V. and Brix, K. (2002) Thyroid stimulating hormone upregulates secretion of cathepsin B from thyroid epithelial cells. *Biol Chem*, **383**, 773-784.
- Lo M.K.**, Rota P.A. (2008) The emergence of Nipah virus, a highly pathogenic paramyxovirus. *J Clin Virol*, **43**, 369-400
- Lou, Z.**, Xu, Y., Xiang, K., Su, N., Qin, L., Li, X., Gao, G.F., Bartlam, M. and Rao, Z. (2006) Crystal structures of Nipah and Hendra virus fusion core proteins. *FEBS J*, **273**, 4538-4547.
- Luby, S.P.**, Rahman, M., Hossain, M.J., Blum, L.S., Husain, M.M., Gurley, E., Khan, R., Ahmed, B.N., Rahman, S., Nahar, N., Kenah, E., Comer, J.A. and Ksiazek, T.G. (2006) Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, **12**, 1888-1894.
- Luby S.P.** (2013) The pandemic potential of Nipah virus. *Antiviral Res*, **100**, 38-34
- Luby S.P.**, Rahman M., Hossain M.J., Blum L.S., Husain M.M., Gurley E., Khan R., Ahmed B.N., Rahman S., Nahar N., Kenah E., Comer J.A., Ksiazek T.G. (2006) Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, **10**, 1888-1894
- Luby S.P.** (2013) The pandemic potential of Nipah virus. *Antiviral Res*, **100**, 38-43
- Maisner, A.**, Mrkic, B., Herrler, G., Moll, M., Billeter, M.A., Cattaneo, R. and Klenk, H.D. (2000) Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity. *J Gen Virol*, **81**, 441-449.

- Marsh G.A.**, de Jong C., Barr J.A., Tachedjian M., Smith C., Middleton D., Yu M., Todd S., Foord A.J., Haring V., Payne J., Robinson R., Broz I., Crameri G., Field H.E., Wang L.F. (2012) Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats. *PLoS Pathog.*, **8**, 8
- Matrosovich M.N.**, Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.D. (2004) Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4620-4624
- McGrath, M.E.** (1999) The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **28**, 181-204.
- Middleton D.J.**, Westbury H.A., Morrissy C.J., van der Heide B.M., Russell G.M., Braun M.A., Hyatt A.D. (2002) Experimental Nipah virus infection in pigs and cats. *J. Comp. Pathol.*, **126**, 124–136
- Modrow, S.**, Falke, D., Tryen, U. (2003) paramyxoviren. In: Molekulare Virologie. Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 265-300.
- Mohamed, M.M.** and Sloane, B.F. (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer, *Nat Rev Cancer*, **6**, 764-775.
- Mohd Nor, M.N.**, Gan, C.H. and Ong, B.L. (2000) Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev Sci Tech*, **19**, 160-165.
- Moin, K.**, Demchik, L., Mai, J., Duessing, J., Peters, C. and Sloane, B.F. (2000) Observing proteases in living cells. *Adv Exp Med Biol*, **477**, 391-401.
- Moll, M.**, Kaufmann, A. and Maisner, A. (2004) Influence of N-glycans on processing and biological activity of the nipah virus fusion protein. *J Virol*, **78**, 7274-7278.
- Moll, M.**, Diederich, S., Klenk, H.D., Czub, M. and Maisner, A. (2004) Ubiquitous activation of the Nipah virus fusion protein does not require a basic amino acid at the cleavage site. *J Virol*, **78**, 9705-9712.
- Mori, Y.**, Yamashita, T., Tanaka, Y., Tsuda, Y., Abe, T., Moriishi, K. and Matsuura, Y. (2007) Processing of capsid protein by cathepsin L plays a crucial role in replication of Japanese encephalitis virus in neural and macrophage cells. *J Virol*, **81**, 8477-8487.
- Morchang A.**, Panaampon J., Suttitheptumrong A., Yasamut U., Noisakran S., Yenchitsomanus P.T., Limjindaporn T. (2013) Role of cathepsin B in dengue virus-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **438**, 20-25
- Mueller-Steiner, S.**, Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E.D., Sun, B., Chen, J., Wang, X., Yu, G., Esposito, L., Mucke, L. and Gan, L. (2006) Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications of Alzheimer's disease. *Neuron*, **51**, 703-714.
- Murphy, F.**, Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabriel, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D. (1995) Virus taxonomy, Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer-verlag, Wien.
- Murray, K.**, Selleck, P., Hooper, P., Hyatt, A., Gould, A., Gleeson, L., Westbury, H., Hiley, L., Selvey, L., Rodwell, B. and et al. (1995) A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science*, **268**, 94-97.
- Nahar N.**, Mondal U.K., Sultana R., Hossain M.J., Khan M.S., Gurley E.S., Oliveras E., Luby S.P. (2013) Piloting the use of indigenous methods to prevent Nipah virus infection by interrupting bats' access to date palm sap in Bangladesh. *Health Promot Int*, **28**, 378-86
- Nedelman J.**, Heagerty P., Lawrence C. (1992) Quantitative PCR with internal controls. *Comput Appl Biosci*, **8**, 65-70

- Negrete, O.A.**, Levroney, E.L., Aguilar, H.C., Bertolotti-Ciarlet, A., Nazarian, R., Tajyar, S. and Lee, B. (2005) EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature*, **436**, 401-405.
- Negrete, O.A.**, Wolf, M.C., Aguilar, H.C., Enterlein, S., Wang, W., Muhlberger, E., Su, S.V., Bertolotti-Ciarlet, A., Flick, R. and Lee, B. (2006) Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. *PLoS Pathog*, **2**, e7.
- Ng, B.Y.**, Lim, C.C., Yeoh, A. and Lee, W.L. (2004) Neuropsychiatric sequelae of Nipah virus encephalitis. *J neuropsychiatry Clin Neurosci*, **16**, 500-504.
- Nomura, T.** and Katunuma, N. (2005) Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *J Med Invest*, **52**, 1-9.
- Pager, C.T.** and Dutch, R.E. (2005) Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein. *J Virol*, **79**, 12714-12720.
- Pager, C.T.**, Craft, W.W., Jr., Patch, J. and Dutch, R.E. (2006) A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L. *Virology*, **346**, 251-257.
- Park, M.S.**, Shaw, M.L., Munoz-Jordan, J., Cros, J.F., Nakaya, T., Bouvier, N., Palese, P., Garcia-Sastre, A. and Basler, C.F. (2003) Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V,W and C proteins. *J Virol*, **77**, 1501-1511.
- Pascall J.C.**, Brown K.D. (2004) Intramembrane cleavage of ephrinB3 by the human rhomboid family protease, RHBDL2. *Biochem Biophys Res Commun*, **317**, 244-252
- Pasquale E.B.** (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*, **133**, 38-52
- Patch, J.R.**, Cramer, G., Wang, L.F., Eaton, B.T. and Broder, C.C. (2007) Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein. *Virol J*, **4**:1.
- Paton, N.I.**, Leo, Y.S., Zaki, S.R., Auchus, A.P., Lee, K.E., Ling, A.E., Chew, S.K., Ang, B., Rollin, P.E., Umapathi, T., Sng, I., Lee, C.C., Lim, E. and Ksiazek, T.G. (1999) Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet*, **354**, 1253-1256.
- Patterson, J.B.**, Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M.A. and Oldstone, M.B. (2000) V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology*, **267**, 80-89.
- Peri P.**, Nuutila K., Vuorinen T., Saukko P., Hukkanen V. (2011) Cathepsins are involved in virus-induced cell death in ICP4 and Us3 deletion mutant herpes simplex virus type 1-infected monocytic cells. *J Gen Virol*, **92**, 173-180
- Pernet O.**, Wang Y.E., Lee B. (2012) Henipavirus receptor usage and tropism. *Curr Top Microbiol Immunol*, **359**, 59-78
- Pitulescu M.E.**, Schmidt I., Benedito R., Adams R.H. (2010) Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc*, **5**, 1518-1534
- Rahman M.A.**, Hossain M.J., Sultana S., Homaira N., Khan S.U., Rahman M., Gurley E.S., Rollin P.E., Lo M.K., Comer J.A., Lowe L., Rota P.A., Ksiazek T.G., Kenah E., Sharker Y., Luby S.P. (2012) Date palm sap linked to Nipah virus outbreak in Bangladesh, 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **10**, 65-72
- Rawlings, N.D.**, Morton, F.R. and Barrett, A.J. (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, **34**, D270-D272.
- Reinheckel, T.**, Deussing, J., Roth, W. and Peters, C. (2001) Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem*, **382**, 735-741.

- Rockx B.**, Winegar R., Freiberg A.N. (2012) Recent progress in henipavirus research: molecular biology, genetic diversity, animal models. *Antiviral Res*, **95**, 135-149
- Rockx B.**, Brining D., Kramer J., Callison J., Ebihara H., Mansfield K., Feldmann H. (2011) Clinical outcome of henipavirus infection in hamsters is determined by the route and dose of infection. *J Virol*, **85**, 7658–7671
- Rodriguez, J.J.**, parisien, J.P. and Horvath, C.M. (2002) Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J Virol*, **76**, 11476-11483.
- Rodriguez-Boulan E.**, Nelson W.J.(1989) Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science*,**245**, 718-725
- Rosseau S.**, Selhorst J., Wiechmann K., Leissner K., Maus U., Mayer K., Grimminger F., Seeger W., Lohmeyer J. (2000) Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol*, **164**, 427-425
- Rudensky, A.** and Beers, C. (2006) Lysosomal cysteine proteases and antigen presentation. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 81-95.
- Sauerhering, L.** (2009) Die Rolle von Cathepsin L und B in der Prozessierung des Nipahvirus-Fuionsproteins
- Schaschke, N.**, Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W., Turk, D. and Moroder, L. (1997) E-64 analogues as inhibitors of cathepsin B. On the role of the absolute configuration of the epoxysuccinyl group. *Bioorg Med Chem*, **5**, 1789-1797.
- Schaschke, N.**, Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W. and Moroder, L. (1998) Substrate/propeptide-derived endo-epoxysuccinyl peptides as highly potent and selective cathepsin B inhibitors. *FEBS Lett*, **421**, 80-82.
- Schaschke, N.**, Deluca, D., Assfalg-Machleidt, I., Höhneke, C., Sommerhoff, C.P. and Machleidt, W. (2002) Epoxysuccinyl peptide-derived cathepsin B inhibitors: modulating membrane permeability by conjugation with the C-Terminal heptapeptide segment of penetratin. *Biol Chem*, **383**, 849-852.
- Schornberg, K.**, Matsuyama, S., Kabsch, K., Delos, S., Bouton, A. and White, J. (2006) Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol*, **80**, 4174-4178.
- Sejvar, J.J.**, hossain, J., Saha, S.K., Gurley, E.S., Banu, S., Hamadani, J.D., Faiz, M.A., Siddiqui, F.M., Mohammed, Q.D., Mollah, A.H., Uddin, R., Alam, R., Rahman, R., Tan, C.T., Bellini, W., Rota, P., Breiman, R.F. and Luby, S.P. (2007) Long-term neurological and functional outcome in Nipah virus infection. *Ann Neurol*, **62**, 235-242.
- Sevenich, L.**, Pennacchino, L.A., Peters, C. and Reinheckel, T. (2006) Human cathepsin L rescues the neurodegeneration and lethality in cathepsin B/L double-deficient mice. *Biol Chem*, **387**, 885-891.
- Simons K.**, Wandinger-Ness A. (1990) Polarized sorting in epithelia. *Cell*, **62**, 207-210
- Simmons, G.**, Gosalia, D.N., Rennekamp, A.J., Reeves, J.D., Diamond, S.L. and Bates, P. (2005) Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11876-11881.
- Takimoto, T.** and Portner, A. (2004) Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res*, **106**, 133-145.
- Tamin, A.**, Harcourt, B.H., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Bellini, W.J. and Rota, P.A. (2002) Functional properties of the fusion and attachment glycoproteins of Nipah virus. *Virology*, **296**, 190-200.

- Tan, C.T.**, Goh, K.J., Wong, K.T., Sarji, S.A., Chua, K.B., Chew, N.K., Murugasu, P., Loh, Y.L., Chong, H.T., Tan, K.S., Thayaparan, T., Kumar, S. and Jusoh, M.R. (2002) Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. *Ann Neurol*, **51**, 703-708.
- Tessier-Lavigne M.** (1995) Eph receptor tyrosine kinases, axon repulsion, and the development of topographic maps. *Cell*, **82**, 345-348
- Thiel L.**, Diederich S., Erbar S, Pfaff D., Augustin H.G., Maisner A. (2008) Ephrin-B2 expression critically influences Nipah virus infection independent of its cytoplasmic tail. *Virology*, **5**, 163
- Trompette A.**, (2009) Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*, **457**, 585-588
- Turk, B.**, Turk, D. and Turk, V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 98-111.
- Turk, V.** and Bode, W. (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett*, **285**, 213-219.
- Turk, V.**, Turk, B. and Turk, D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J*, **20**, 4629-4633.
- Valarcher J. F.**, Taylor G. (2007) Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res*, **38**, 153-180
- Vogt, C.** (2004) Einfluss der Tyrosine in den zytoplasmatischen Domänen der Nipahvirus-Glykoproteine auf Endozytose und Transport in polarisierten Epithelzellen. Diplomarbeit am Fachbereich Medizin, Philipps-Universität, Marburg.
- Vogt, C.**, Eickmann, M., Diederich, S., Moll, M. and Maisner, A. (2005) Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins. *J Virol*, **79**, 3865-3872.
- Vulliemoz, D.** and Roux, L. (2001) "Rule of six": how does the Sendai virus RNA polymerase keep count? *J Virol*, **75**, 4506-4518.
- Wacharapluesadee, S.** and Hemachudha, T. (2007) Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats. *J Virol Methods*, **141**, 97-101.
- Walpita, P.** and Peters, C.J. (2007) Cis-acting elements in the antigenomic promoter of Nipah virus. *J Gen Virol*, **88**, 2542-2551.
- Wang, H.U.**, Chen, Z.F. and Anderson, D.J. (1998) Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptors Eph-B4. *Cell*, **93**, 741-753.
- Wang, L.**, Harcourt, B.H., Yu, M., Tamin, A., Rota, P.A., Bellini, W.J. and Eaton, B.T. (2001) Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect*, **3**, 279-287.
- Wang, L.F.**, Yu, M., Hansson, E., Pritchard, L.I., Shiell, B., Michalski, W.P. and Eaton, B.T. (2000) The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae. *J Virol*, **74**, 9972-9979.
- Wang H.U.**, Anderson D.J. (1997) Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron*, **18**, 383-396
- Weingartl H.**, Czib S., Copps J., Berhane Y., Middleton D., Marszal P., Gren J., Smith G., Ganske S., Manning L., Czib M. (2005) Invasion of the central nervous system in a porcine host by nipah virus. *J Virol*, **79**, 7528-34

- Weingartl H.**, Czub S., Copps J., Berhane Y., Middleton D., Marszal P., Gren J., Smith G., Ganske S., Manning L., Czub M. (2005) Invasion of the central nervous system in a porcine host by nipah virus. *J Virol*, **79**, 7528–7534
- Weingartl H.M.**, Berhane Y., Czub M. (2009) Animal models of henipavirus infection: a review. *Vet J*, **181**, 211-220
- Wilkinson D.G.**(2001) Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 155-164
- Wong, K.T.**, Shieh, W.J., Kumar, S., Norain, K., Abdullah, W., Guarner, J., Goldsmith, C.S., Chua, K.B., Lam, S.K., Tan, C.T., Goh, K.J., Chong, H.T., Jusoh, R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G. and Zaki, S.R. (2002) Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. *Am J Pathol*, **161**, 2153-2167.
- Wong, K.T.**, Shieh, W.J., Zaki, S.R. and Tan, C.T. (2002) Nipah virus infection, an emerging paramyxoviral zoonosis. *Springer Semin Immunopathol*, **24**, 215-228.
- Wright J.R.** (2005) Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*, **5**, 58-68
- Xi H.Q.**, Wu X.S., Wei B., Chen L. (2012) Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy. *J Cell Mol Med*, **16**, 2894-2909
- Xu, Y.**, Gao, S., Cole, D.K., Zhu, J., Su, N., Wang, H., Gao, G.F. and Rao, Z. (2004) Basis for fusion inhibition by peptides: analysis of the heptad repeat regions of the fusion proteins from Nipah and Hendra viruses, newly emergent zoonotic paramyxoviruses. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 664-670.
- Yob, J.M.**, Field, H., Rashdi, A.M., Morrissy, C., van der Heide, B., Rota, P., bin Adzhar, A., White, J., Daniels, P., Jamaluddin, A. and Ksiazek, T. (2001) Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis*, **7**, 439-441.
- Yoneda M.**, Guillaume V., Ikeda F., Sakuma Y., Sato H., Wild T.F., Kai C. (2006) Establishment of a Nipah virus rescue system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16508-16513
- Zavasnik-Bergant, T.** and Turk, B. (2006) cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens*, **67**, 349-355.

A1 Anhang

A 1.1 RT-PCR mit Ephrin B2 und Ephrin B3 spezifischen Primern (HTEpC und PTEpC)

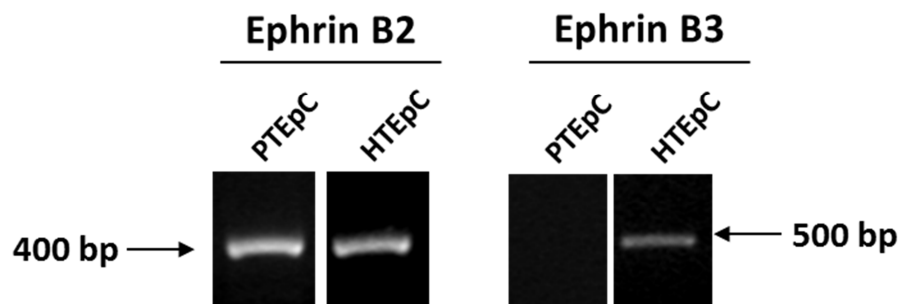


Abb. A.1: RT-PCR mit Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 spezifischen Primern. 5×10^5 PTEpC und HTEpC wurden für die RNA-Isolation mit dem RNeasy® Kit eingesetzt. Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des *One Step* RT-PCR Kits und Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 spezifischen Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden dann in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid angefärbt.

A.1.2 Ephrin B2-mRNA-Level in HTEpC

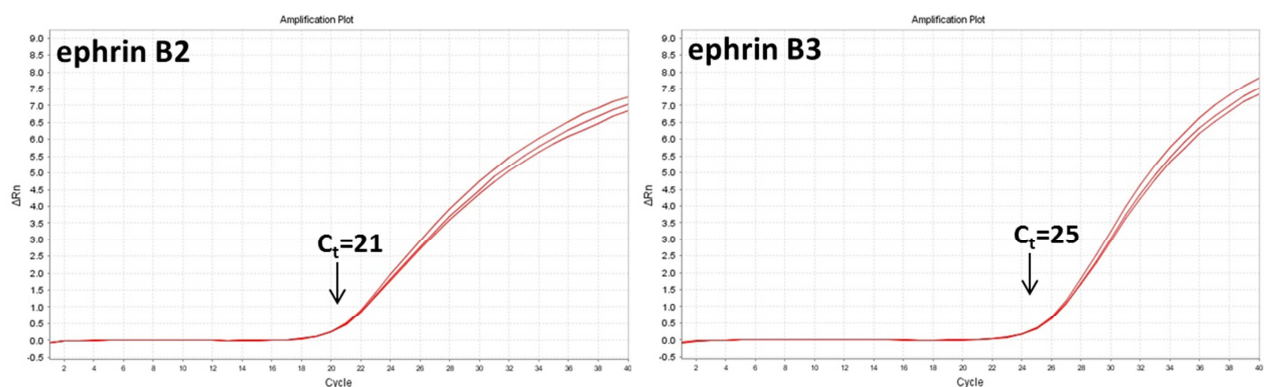


Abb. A.2: Ephrin B2- und Ephrin B3-mRNA-Level HTEpC. Die gesamte RNA wurde mittels RNeasy®-Kit isoliert und anschließend via RT-PCR und *random hexamer*-Primern in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde eine quantitative *qPCR* mit spezifischen Primern gegen Ephrin B2 und Ephrin B3 durchgeführt.

A.1.3 Infektion von HTEpC

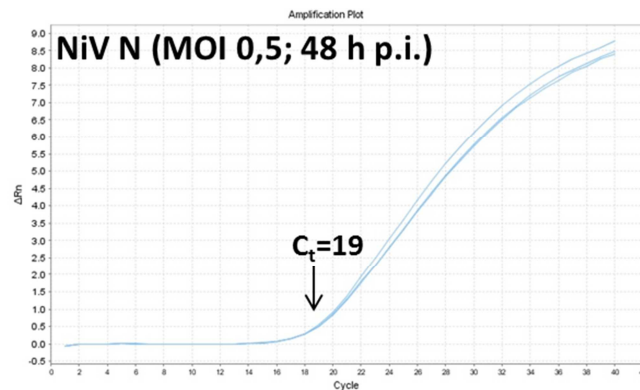


Abb. A.3: Nachweis der NiV-Infektion in HTEpC. HTEpC wurden auf Kollagen-beschichteten *6well*-Platten ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen im Hochsicherheitslabor mit NiV (MOI von 0,5) infiziert. Die RNA wurde 48 h p.i. aus den Zelllysaten mittels RNAeasy®-Kit isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte die qPCR mit spezifischen Primern gegen NiV-N, Ephrin B2 und als interne Kontrolle Tubulin.

A.1.4 Ephrin B2-mRNA in alveolären Zellen

AEC (AG Herold)

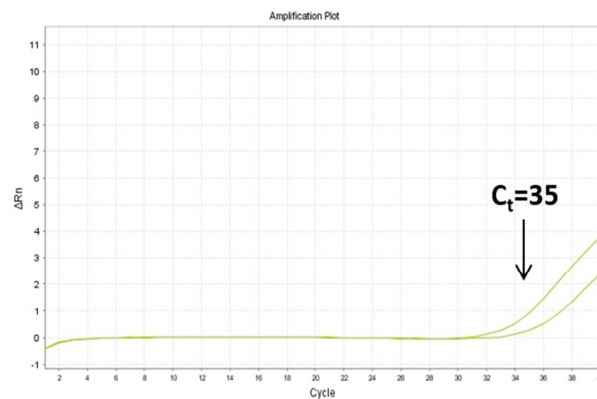


Abb. A.4: Ephrin B2-mRNA-Level in AEC (alveolären Zellen). Die Zellen wurden uns von der AG Herold von der Justus-Liebig-Universität in Gießen zur Verfügung gestellt. Die gesamte RNA wurde mittels RNeasy®-Kit isoliert und anschließend via RT-PCR und *random hexamer*-Primern in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde eine quantitative qPCR mit spezifischen Primern gegen Ephrin B2 durchgeführt.

A.2 Publikationsliste

Veröffentlichungen

Lamp B., Dietzel E., Kolesnikova L., Sauerhering L., Erbar S., Weingartl H., and Maisner A. (2013) Nipah virus entry and egress from polarized epithelial cells, JVI, doi:10.1128/JVI.02696-12

Diederich S., Sauerhering L., Weis M., Altmeyen H., Schaschke N., Reinheckel T., Erbar S., and Maisner A. (2012) Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells is mediated by cathepsin B within the endosomal-recycling compartment JVI, doi: 10.1128/JVI.06628-11

Präsentationen

Vorträge

Sauerhering L. and Maisner A. (2014) Ephrin B2 expression in different bronchial epithelial cells and the influence of receptor levels on NiV infection; Graduate School 1216 Retreat Rauschholzhausen, Germany

Sauerhering L., Erbar S. and Maisner A. (2012) A comparative study on Nipah virus infection in human and porcine airway epithelial cells; workshop of the Graduate School 1216 "Intra- und interzellulärer Transport und Kommunikation", Kleinwalsertal, Austria

Sauerhering L., Erbar S. and Maisner A. (2011) Primary epithelial cells freshly isolated from pig lungs: A model to study Nipah virus infection of respiratory epithelia; Minisymposium im Rahmen des Loewe-Projektes "Pathogenitätsänderungen von Viren", Marburg, Germany

Sauerhering L., Erbar S. and Maisner A. (2011) Studies on NiV infection in porcine and human bronchial epithelial cell; XXI. Measles Meeting, Würzburg, Germany

Sauerhering L., Erbar S. and Maisner A. (2010) Nipah virus infection of primary bronchial epithelia; XX. Measles Meeting, Würzburg, Germany

Poster

Weis M., Sauerhering L., Diederich S. and Maisner A. (2013) Endosomal Trafficking of the Nipah Virus Fusion Protein, 15th International Negative Strand Virus Meeting, Granada, Spain

Sauerhering L., Erbar S. and Maisner A. (2012) Comparison of Nipah virus infection in human and porcine airway epithelial cells, 22nd Meeting of the Society for Virology, Essen, Germany

Sauerhering L., Erbar S. and Maisner A. (2012) Effects of Nipah virus infection on adhesion and tight junction molecules in different airway epithelial cells, International Symposium of the SFB 593 "Mechanisms of Cellular Compartmentalization" Marburg, Germany

Sauerhering L., Erbar S. and Maisner A. (2012) Host factors and Nipah virus infection of bronchial epithelial cells, International Conference of the SFB-TR 84 and Leopoldina: Innate immunity of the lung - Improving pneumonia outcome, Berlin, Germany

Sauerhering L., Erbar S. and Maisner A. (2011) Primary bronchial epithelial cells as target for Nipah virus infection; 2nd Student-organized International Symposium of the DFG Research Training Group 1216 "Intra - and Intercellular Transport and Communication", Marburg, Germany

Sauerhering L., Erbar S. and Maisner A. (2011) Nipah virus infection of primary bronchial epithelia; 21st Annual Meeting of the Society for Virology, Freiburg, Germany

A.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Lucie Sauerhering
Anschrift	<div></div> <div></div>
Geburtsdatum	<div></div>
Geburtsort	Eisenach
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1992-1996	Grundschule Ifta
1996-2004	Elisabeth-Gymnasium, Eisenach
Juni 2004	Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/2004-07/2007	Bachelorstudium Biologie, Philipps Universität Marburg
03/2007-07/2007	Bachelorarbeit: Konstruktion von mini-Transposons für die Mutagenese in <i>Rhizobium spec.</i>
Juni 2007	Abschluss: <i>bachelor of science</i>

10/2007-09/2009	Masterstudium Biologie, Philipps Universität Marburg
03/2009-09/2009	Masterarbeit: Die Rolle von Cathepsin L und B in der Prozessierung des nipahviralen Fusionsproteins
September 2009	Abschluss: <i>master of science</i>

Berufliche Tätigkeit

10/2009-03/2010	Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Virologie der Philipps Universität Marburg
05/2010-12/2010	Beschäftigung als Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Virologie der Philipps Universität Marburg
01/2011-12/2013	Doktorandin mit Stipendium am Institut für Virologie der Philipps Universität Marburg
seit 01/2012	assoziiertes Mitglied beim Graduierten Kolleg „Intra-and Intercellular Transport and Communication“ (IITC), Marburg
07/2012-12/2013	Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft am Fachbereich Biologie der Philipps Universität Marburg
seit 01/2014	Beschäftigung als Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Virologie der Philipps Universität Marburg

Wissenschaftliche Hilfskraft für Praktikumsbetreuung

WS 2010/11, 2011/12, 2012/13	Betreuung „Virologisches Praktikum für Masterstudenten der Biologie“
SS 2011, 2012, 2013	Betreuung „Fachmodul 1“ für BSc Humanbiologie
SS 2011, 2012, 2013	Betreuung des Praktikums „Medizinische Mikrobiologie für Mediziner, Teil 2: Virologie und Parasitologie“
WS 2011/12	Betreuung „Vertiefungsmodul Virologie“ und „Wahlfach Virologie“ für Mediziner

Zusätzlich erworbene Qualifikation

07/2012-09/2012	erfolgreiche Einarbeitung in das Hochsicherheitslabor (BSL-4) des Instituts für Virologie, Marburg
-----------------	--

Marburg,

Lucie Sauerhering

A.4 Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei...

... Prof. Dr. Andrea Maisner für die Überlassung des interessanten Themas und die wissenschaftliche Unterstützung insbesondere für die Hilfe bei Vorträgen.

... Prof. Dr. Uwe Maier für die Übernahme des Zweitgutachtens.

... Prof. Dr. Stefan Becker, allen Mitgliedern des Instituts und der ganzen AG-BSL4 für sehr gute Arbeitsbedingungen am Institut und die stetige Hilfsbereitschaft.

... den Mitgliedern des Graduiertenkollegs und meinem *advisory board* (Prof. Dr. Andrea Maisner, Prof. Dr. Uwe Maier, PD Dr. Susanne Önel und Dr. Stefan Zauner) für die Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen für meine Promotionsarbeit.

... der AG Herold und der AG Schmeck für die Zurverfügungstellung von primären Zellen.

... allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ein tolles Arbeitsklima.

... Anja, weil hier ohne dich nichts laufen würde und du mir Lungen mitbringst ☺

... Erik, Joanna, Michael, Laura, Mareike, Hanna, Annika, Thomas, Jan und Steffi für schöne Zeiten inner- und außerhalb der Arbeitszeiten und für „Lachen bis die Tränen kommen“.

... Steffi nicht nur für die Einarbeitung in das Hochsicherheitslabor, sondern auch für schöne Momente zwischen dem Kolosseum in Rom und dem Kraxelsofen in Bad Hersfeld.

... Ina, Svenja, Laura und Lara für euren Rückhalt, Hilfe und einfach, weil es schön ist, Zeit mit euch zu verbringen.

... Erik, Michael und besonders Laura für das Korrekturlesen der Arbeit und Hilfe bei großen, größeren und verdammt riesigen Problemen. Danke, dass ihr immer da seid, auch, wenn ich manchmal wo anders bin ☺.

... André für ein neues Zuhause.

... Uli, Mose, Swen, Herrn König und meiner liebsten Anne für eine jahrelange Freundschaft und unbeschreiblich glückliche Momente.

... meiner ganzen Familie, besonders meinen Eltern und meiner Schwester für Unterstützung, Kraft, Geduld, Trost und Freude.

A.5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	bovines Serumalbumin
BSL4	<i>biosafety level 4</i>
C (°C)	Celcius (Grad Celsius)
CD	zytoplasmatische Domäne
C-Terminus	Carboxyterminus
CTSB	Cathepsin B
CTSL	Cathepsin L
D	Dalton
def	<i>deficient</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB2	Ephrin B2
ER	endoplasmatisches Retikulum
F	Fusionsprotein
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Glykoprotein
h	Stunde
HeV	Hendravirus
IF	Immunfluoreszenz (-analyse)
Ig (IgG)	Immunglobulin (Ig Klasse G)
JEV	Japanisches Enzephalitis Virus
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
L	Polymerase
μ	Mikro
m	Meter
m	Milli
M	Matrixprotein
M	molar (mol/l)
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i> Zellen
ME	Mercaptoethanol
MEF	Mausembryofibroblasten
MEM	<i>minimal essential medium</i>
min	Minute
mol	Mol
mRNA	Messenger RNA
MOI	Multiplicity of infection
n	Nano
N	Nukleoprotein
NC	Nitrozellulose
NiV	Nipahvirus
N-Terminus	Aminoterminal

p	Piko
P	Phosphoprotein
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potential hydrogenii</i>
p.i.	nach Infektion
p.t.	nach Transfektion
RFU	<i>relative fluorescent units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Tab.	Tabelle
TMD	Transmembrandomäne
U	<i>units</i>
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VLP	<i>virus-like particle</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glyzin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

A.6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

		Seite
Tab. I.1	Zusammenfassung des größten NiV-Ausbruchs 2013 in Bangladesch	3
Abb. I.1	Geografische Verteilung des NiV-Ausbruchs in Bangladesch 2013	3
Abb. I.2	Immunhistochemischer Nachweis der NiV-Infektion im Bronchialepithel.	5
Tab.I.2	Charakteristische Vertreter der <i>Paramyxoviridae</i>	7
Abb. I.3	Virusaufbau des NiV	8
Abb. I.4	Darstellung des NiV-Fusionsproteins	11
Abb. I.5	Genomorganisation des NiV	12
Abb. I.6	Darstellung des NiV-Replikationszyklus	14
Abb. I.7	schematischer Aufbau des <i>junction</i> -Komplexes in Epithelzellen (aus Bérubé et al., 2010)	16
Abb. I.8	schematischer Aufbau einer menschlichen Lunge (aus Bérubé et al., 2010)	17
Tab.I.3	Ephrin B2 und Ephrin B3-DNA und Aminosäure-Sequenz Vergleiche von verschiedenen Säugetieren (nach Bossart et al., 2008)	22
Abb. I.9	schematischer Aufbau von Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden (nach Xi et al., 2012)	23
Abb. II.1	Nachweis von Epithelzell-spezifischen Markerproteinen in den isolierten, bronchialen Epithelzellen (PBEPc)	28
Abb. II.2	Nachweis der Zytokeratin-Expression nach mehrmaligem Passagieren der primären PBEPc	29
Abb. II.3	Nachweis von Epithelzell-spezifischen Markerproteinen in den kommerziell erhältlichen bronchialen, humanen Epithelzellen (HBEPc)	29
Abb. II.4	qPCR-Nachweis von ICAM-1, VCAM-1 und Occludin nach TNF α -Stimulation	31
Abb.II.5	Vergleich der Infizierbarkeit von sub-konfluenten PBEPc und HBEPc mit NiV	34
Abb. II.6	Vergleich apikale und basale Infektion von PBEPc und HBEPc mit NiV	36

Abb. II.7	NiV-Freisetzung aus infizierten humanen und porcinen Epithelzellen	37
Abb. II.8	Bestimmung der Cathepsin L- und Cathepsin B-Aktivitäten in verschiedenen primären Zellen	39
Abb. II.9	Spaltung des NiV-Fusionsproteins in PBEpC und HBEpC	40
Abb. II.10	Einfluss spezifischer Cathepsin-Inhibitoren auf die NiV-F-Spaltung	42
Abb. II.11	RT-PCR mit Ephrin B2 bzw. Ephrin B3 spezifischen Primern	43
Abb. II.12	Quantitativer Vergleich der Ephrin B2- und Ephrin B3-mRNA-Level in PBEpC und HBEpC	44
Abb. II.13	Auswirkung der NiV-Infektion auf das Ephrin B2-Level von infizierten PBEpC	46
Abb. II.14	Indirekter Nachweis der funktionellen Rezeptorexpression in PBEpC und HBEpC mittels „Overlay-Fusionsassay“	48
Abb. II.15	„Overlay-Fusionsassay“ von NiV-F und NiV-G exprimierenden HeLa-Zellen auf PBEpC und HBEpC	49
Abb. II.16	Nachweis der erfolgreichen Expression von humanem Ephrin B2 in PBEpC	51
Abb. II.17	Auswirkungen der Ephrin B2-Transfektion auf die Ephrin B3- und Tubulin-mRNA	52
Abb. II.18	Auswirkung einer zusätzlichen Expression von humanem Ephrin B2 auf die Synzytienformation in NiV-F und NiV-G transfizierten PBEpC	53
Abb. II.19	„Overlay-Fusionsassay“ nach Vortransfektion von humanem Ephrin B2	54
Abb. II.20	Nachweis viraler RNA im Zellkulturüberstand in Ephrin B2-transfizierten und anschließend infizierten PBEpC (48 h p.i.)	56
Abb. II.21	Auswirkung der zusätzlichen Expression von humanem Ephrin B2 auf die NiV-Infektion in PBEpC	57
Abb. II.22	Vergleich der Ephrin B2-mRNA in HBEpC aus verschiedenen humanen Spendern (ProVitro)	59
Abb. II.23	Vergleich der Ephrin B2-mRNA in humanen Zellen aus Patientenmaterial (zur Verfügung gestellt von AG Schmeck, iLung, Marburg)	60
Abb. II.24	NiV-Infektion von HBEpC (Donor 3)	61

Abb. V.1	schematischer Ablauf der Zellisolation	96
Abb. V.2	Schematischer Ablauf des indirektes Nachweis der funktionellen Rezeptorexpression in PBEpC und HBEpC mittels „Overlay-Fusionsassay“. (modifiziert nach Lena Thiel, 2008 und Stephanie Erbar, 2010)	100
Abb. V.3	Costar-Transwell-Filter (A) und Schematischer Aufbau (B) des Transwell-Filter-Systems zur Kultivierung von polarisierten Epithelzellen	101

A.7 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Einfluss von Wirtsfaktoren auf die Nipahvirus-Infektion humaner und porciner Bronchial-Epithelzellen“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in der Fachzeitschrift *Journal of Virology* veröffentlicht.

Ort, Datum

Lucie Sauerhering

